



Universidad Andrés Bello
Facultad de Ciencias Biológicas
Ingeniería en Biotecnología

“Desarrollo de biosensores multiespectrales”

Proyecto de Tesis presentado como parte de los requisitos para optar al Grado de
Magíster en Biotecnología

Codirector de Tesis: Dr. Timothy Rudge
Instituto de Ingeniería Biológica y Médica
Pontificia Universidad Católica de Chile

Codirector de Tesis: Dr. Fernán Federici
Facultad de Ciencias Biológicas
Pontificia Universidad Católica de Chile

Profesor Patrocinante: Dr. Fernando González Nilo
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Andrés Bello

Macarena Andrea Muñoz Silva
Santiago, Chile.
Año 2019.



Universidad Andrés Bello
Facultad de Ciencias Biológicas
Ingeniería en Biotecnología

"Desarrollo de biosensores multiespectrales"
Macarena Andrea Muñoz Silva

Este trabajo fue elaborado bajo la supervisión de los Directores de Tesis Dr. Timothy Rudge y Dr. Fernán Federici, en el Laboratorio de Biología Sintética, Pontificia Universidad Católica de Chile, aprobado por los miembros de la Comisión de evaluación.

Dr. Eduardo Castro
Comisión de Tesis

Dr. Giovanni Giachetti
Comisión de Tesis

Dr. Fernán Federici
Director de Tesis

Dr. Timothy Rudge
Director de Tesis

Dr. Fernando González
Profesor Patrocinante

Santiago, Chile.

Año 2019

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mis profesores Tim y Fernán, por darme la oportunidad de estar en su laboratorio, confiar en mi trabajo y darme su apoyo y ayuda en todo momento frente a todas las dificultades que se presentaron. Gracias por permitirme aprender tanto durante todo este tiempo. También quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio por la ayuda y apoyo durante este proceso, y por permitirme aprender de ellos y su trabajo. Gracias también a los chicos del laboratorio de Egaña por todo su apoyo, cariño y las discusiones científicas al almuerzo y con cervezas, gracias por hacer la vida en el lab más amena.

Gracias a mis dos familias por estar presentes en todo momento. En primer lugar, a mi Mamá, Pita, Nona y Lelo, sin ustedes y su amor, su paciencia, consejos, ayuda y apoyo no habría sido posible llegar hasta acá, sin ustedes no soy ni sería nada, son mi vida. Gracias Mamá por darme el mejor ejemplo que puede existir, por nunca dejar de creer en mí, por siempre darme el empujón cuando no podía más.

A mi Papá y Pauli por todo su amor, apoyo y ánimo, son parte importante de este proceso, gracias por estar ahí siempre. Gracias Papá por todo.

A mis hermanos Nanna, Mati, Andrés y Gabi, gracias por cuidarme y soportarme en mis buenos y malos momentos. Nannita, gracias por ser mi partner, entenderme y recordarme cual es el camino.

A mis hermanos de la vida, Firi y Edo, ustedes son de mis pilares fundamentales, no habría llegado hasta acá sin su ánimo, consejos, contención y llamados de atención para volver al camino y mantenerme firme. Son lo mejor que me pudo dar el universo, gracias por entenderme aún sin palabras y por su amor infinito. Firi gracias por ser mi primera hermana, crecer conmigo y acompañarme a en buenas y malas. Edo, gracias por ser el mejor compañero que existe, por ayudarme tanto, por alegrarme tanto. Gracias a ambos por tanto, los amo hasta el fin de los tiempos.

Gracias Nela y Mariel por estar ahí a pesar de la distancia, de los tiempos y de los años, su cariño es lo más lindo, gracias por hacer mi vida más bonita.

Fran, mi compañera de equipo, mi partner científico y de la vida, gracias todo, por enseñarme tanto, cuidarme tanto y apoyarme tanto como lo haces, te admiro profundamente. Gracias por confiar en mí siempre.

Shago, Karla, Pieri, Gabo, Pauli, gracias por ser mis compañeros y amigos en este camino, agradezco tanto por ustedes, los admiro muchísimo, son las mejores personas con las que pude haber compartido este proceso.

Mis horribles, Ivi, Chris, Oporto, Oriel, Su, Elea, gracias por ser una familia para mí en esta ciudad, por todo su apoyo y cariño, por tantos carretes y tallas. Gracias por hacer mi vida aún más alegre, y por seguir a mi lado hasta hoy.

Cami, gracias por ser mi primera amiga en este lugar, y porque seguimos aquí la una para la otra, por acogerme en tu casa junto a tu hermosa familia, por quererme de la forma que lo haces.

Thiare, amiga, gracias por darme tu energía y alegría siempre, admiro profundamente la garra con la que vives tu vida. Gracias por estar ahí a pesar de los miles de kilómetros de distancia, eres la mejor.

Querido Felipe, gracias por haber sido mi primer profe, por enseñarme disciplina y rigurosidad para trabajar, por ayudarme a pensar y discutir la ciencia, me entregaste herramientas fundamentales y una amistad de las mejores. Gracias por tanto.

Any y Rodo, gracias por darme la oportunidad de amar lo que hago, por confiar en mi trabajo y en mí como persona. Any gracias por tu magia y tu cariño, una amiga como tú no se encuentra en cualquier parte, eres admirable en todo sentido. Gracias por enseñarme tanto.

Finalmente, quiero agradecer a Giannina, por salvarme, por ayudarme a encontrar el camino de vuelta y a encontrarme durante todos estos años, no podría haber tenido más suerte de conocerla. Giannina gracias por darme un refugio y una base sólida para crecer. Gran parte de esto, de seguir en este mundo y haber llegado al final se lo debo a usted. Gracias por todo.

Índice

1. ABREVIATURAS.....	10
2. RESUMEN.....	11
3. INTRODUCCIÓN.....	12
3.1 Biología sintética	12
3.2 Partes, dispositivos y sistemas de regulación transcripcional	12
3.3 Construcción de Sistemas.....	13
3.3.1 Ensamblaje <i>Gibson</i>	13
3.3.2 Clonamiento <i>Golden Gate</i>	14
3.4 Sistemas de regulación génica y su utilización como biosensores	14
3.4.1 Selectividad de los biosensores	15
3.5 Biosensores microbianos	15
3.6 Tipos de señales de detección.....	16
3.7 Estudio de la dinámica de redes génicas en respuesta a la presencia de compuestos de interés... ..	17
3.8 Teoría de información, Entropía, Entropía condicional e Información mutua	20
3.8.1 Entropía de información	20
3.8.2 Entropía conjunta	20
3.8.3 Entropía condicional.....	20
3.8.4 Información mutua.....	21
3.9 Hipótesis.....	22
3.10 Objetivos.....	22
3.10.1 Objetivo general	22
3.10.2 Objetivos específicos	22
4. MATERIALES Y MÉTODOS	23
4.1 Material biológico.....	23
4.1.1 Cepas Bacterianas	23
4.2 Diseño experimental.....	23
4.2.1 Implementar un sistema de ensamblaje de ADN que permita la fabricación combinatorial y eficiente de sistemas genéticos.	23
4.2.2 Purificación de piezas de ADN para ensamblaje desde gel	33
4.2.3 Transformación de bacterias.....	33
4.2.4 Selección colonias positivas de bacterias transformadas, stocks en glicerol y cultivos líquidos	34
4.2.5 Extracción y purificación de plásmidos utilizando un kit comercial.....	35
4.2.6 Evaluar si la utilización de dos reporteros de referencia otorga mayor robustez a la información obtenida con un tercer reportero	35
4.2.7 Evaluar si la utilización de tres reporteros otorga información suficiente para distinguir/analizar más de dos señales de interés.....	37

4.2.8 Analizar la información contenida en las mediciones de fluorescencia y densidad con respeto al entorno y las señales.....	38
5. RESULTADOS	42
5.1 Librería de vectores.....	42
5.2 Los valores de α_p son diferentes entre condiciones y están influenciados por factores extrínsecos	44
5.3 Utilizar una referencia disminuye la variación extrínseca en la expresión del reportero de interés ..	47
5.4 El uso de dos o más referencias reduce la incertidumbre en las mediciones de fluorescencia.....	49
5.6 La presencia de inductores puede producir cambios en la Entropía de las mediciones	55
6. DISCUSIÓN.....	58
6.1 Construcción de una librería de vectores mediante un sistema de ensamblaje combinatorial	58
6.2 El análisis ratiométrico no es suficiente para eliminar la variación extrínseca al contar con tres reporteros	58
6.3 La relación y expresión de los reporteros en el tiempo es compleja	61
6.4 El uso de la Entropía de Información es útil para reducir la variación extrínseca de los reporteros .	62
6.5 El uso de la Entropía de Información es útil para detectar la presencia de inductores	64
7. CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES	66
7.1 Conclusiones	66
7.2 Proyecciones	66
8. REFERENCIAS	68
ANEXO	72

Índice de Tablas

Tabla 4.2.1.1: “Templados y secuencia de partidores para amplificación de piezas para el vector 1X_p15a_Cyan”	25
Tabla 4.2.1.2: “Templados y secuencia de partidores para amplificación de piezas para el vector 1X_SEG_Tur”	25
Tabla 4.2.1.3: “Mix de reacción de PCR para Polimerasa Phusion”	26
Tabla 4.2.1.4: “Mix de reacción para Ensamblaje <i>Gibson</i> ”	27
Tabla 4.2.1.5: “Partes de las Unidades Transcripcionales 1, en el vector 12X”	28
Tabla 4.2.1.6: “Partes de las Unidades Transcripcionales 2, en el vector 23X”	29
Tabla 4.2.1.7: “Secuencias flanqueantes para sistema <i>CIDAR MoClo</i> ”	29
Tabla 4.2.1.8: “Combinaciones de TUs para el vector 1X_p15a_Cyan”	31
Tabla 4.2.1.9: “Secuencia de UNSes utilizadas y partidores para amplificación piezas”	32
Tabla 4.2.1.10: “Partes de unidad transcripcional de TetR”	32
Tabla 4.2.1.11: “Secuencia de UNSes utilizadas y partidores para amplificación piezas del vector accesorio”	33
Tabla 4.2.4.1: “Mix Polimerasa Gotaq”	34
Tabla 4.2.6.1: “Composición medio M9 para ensayos de crecimiento”	36
Tabla 4.2.6.2: “Vectores evaluados por ensayo”	36
Tabla 4.2.7.1: “Concentraciones de señales evaluadas”	38
Tabla 5.1.1: “Librerías de vectores construidos”	42

Índice de Figuras

Figura 3.7.1. Pasos para la síntesis de un reportero fluorescente.	18
Figura 3.7.2. Método de dos reporteros para extraer información de variabilidad específica del promotor de interés.	19
Figura 3.8.1. Diagramas de representación de entropías e información mutua	21
Figura 4.2.1.1. Esquema de reacción isotérmica de Ensamblaje <i>Gibson</i>	24
Figura 4.2.1.2. Fórmulas de cálculo de cantidades equimolares para piezas de Ensamblaje <i>Gibson</i>	26
Figura 4.2.1.3. Fórmulas para cálculos de cantidades equimolares para módulos de nivel 0.	30
Figura 4.2.1.4. Ensamblaje <i>Gibson</i> mediante utilización de UNSes.	31
Figura 5.2.1. Valores de Alfas (α_p) entre condiciones.	46
Figura 5.3.1. Las razones (ρ_p) entre Alfas reducen la variación en los reporteros	48
Figura 5.5.1. Diagramas de representación de entropías e información mutua para las mediciones evaluadas.	49
Figura 5.4.2. Variación de los datos de los controles en el tiempo.	50
Figura 5.4.3. Variación en el tiempo de las mediciones del vector J23101-J23101-J23101 en Glucosa 0,4%.	51
Figura 5.4.4. Variación en el tiempo de las mediciones del vector J23101-J23101-J23101 en Glicerol 0,2%.	51
Figura 5.4.5. Entropías independientes y condicionales para los vectores en Glucosa 0,4%.	53
Figura 5.4.6. Entropías independientes y condicionales para los vectores en Glicerol 0,2%.	54
Figura 5.6.1. Entropías condicionales de vectores expuestos o no a inductores	56
Figura 5.6.2. ANOVA para entropías condicional $H(dp_1 dp_2, dp_3, OD)$	57
Figura Anexo 1. Esquema representativo de un represor transcripcional	73
Figura Anexo 2. Esquema de combinaciones para clonamiento Golden Gate	73
Figura Anexo 3. Esquema de ensamblaje <i>Gibson</i> de los vectores finales.	74
Figura Anexo 4. Esquema ejemplo de la disposición de vectores en placas para ensayos.	75
Figura Anexo 5. Regulación de pTet y pLacI en colonias cotransformadas con el vector accesorio.	75
Figura Anexo 6. Ajuste Gompertz realizado al promedio de la colonia del vector J23101-J23101-J23101.	76

Figura Anexo 7. Ajuste lineal realizado a las mediciones de fluorescencia en base a lo determinado por ajuste de densidad óptica.....	76
Figura Anexo 8. Valores de alfa para ensayo 1.	77
Figura Anexo 9. Valores de alfa para ensayo 2.	78
Figura Anexo 10. Valores de alfa para ensayo 3.	79
Figura Anexo 11. Valores de alfa para ensayo 4.	80
Figura Anexo 12. Valores de Rho ensayo 1.....	81
Figura Anexo 13. Valores de Rho ensayo 2.....	82
Figura Anexo 14. Valores de Rho ensayo 3.....	83
Figura Anexo 15. Valores de Rho ensayo 4.....	84
Figura Anexo 16. Valores de Rho usando YFP como referencia ensayo 1.....	85
Figura Anexo 17. Valores de Rho usando YFP como referencia ensayo 2.....	86
Figura Anexo 18. Valores de Rho usando YFP como referencia ensayo 3.....	87
Figura Anexo 19. Valores de Rho usando YFP como referencia ensayo 4.....	88

1. ABREVIATURAS

RBS: Sitio de Unión al Ribosoma (Ribosome Binding Site)

CDS: Región Codificante (Coding Sequence)

MoClo: Clonamiento Modular (Modular Cloning)

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

TU: Unidad transcripcional (Transcriptional Unit)

UNSeq: Secuencias Nucleotídicas Unicas (Unique Nucleotide Sequence)

aTc: anhidrotetraciclina

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

GFP: Green fluorescent protein

RFP: Red fluorescent protein

YFP: Yellow fluorescent protein

CFP: Cyan fluorescent protein

2. RESUMEN

El problema que representa la organización y expresión en los sistemas complejos se puede simplificar al considerar las redes génicas como elementos compuestos por subconjuntos de partes o módulos. La biología sintética utiliza este enfoque, aplicando conceptos de la Ingeniería, con el fin de construir sistemas predecibles y robustos con nuevas funciones celulares. En esta disciplina, existe una jerarquía para construir nuevas redes génicas; se encuentran las Partes, que son caracterizadas por distintos métodos, y se combinan para formar Dispositivos, que pueden ser combinados para construir Sistemas transcripcionales. Dado que los organismos poseen redes génicas que son robustas para responder a diversas señales, la biología sintética busca estudiar esta característica para crear sistemas programables, utilizando microorganismos como bacterias que contengan sistemas transcripcionales. Las propiedades ópticas de las sustancias son la base de los biosensores ópticos, algunos de estos se basan en el uso de proteínas fluorescentes como reporteros, utilizando la intensidad y la dinámica de cambio de esta señal para su medición. Los cambios en la expresión de los reporteros se definen mediante variaciones intrínsecas y extrínsecas, las primeras relacionadas al promotor, y las segundas relacionadas al contexto celular y otros factores. Estas variaciones son impredecibles, por lo que es necesario contar con métodos de medición confiables, que permitan diferenciar los cambios específicos en la actividad del promotor que dirige a los reporteros de los cambios globales en la expresión por otros factores al tener frente a señales de interés en el entorno celular. En este trabajo, varios promotores diferentes fueron fusionados a tres reporteros fluorescentes de forma combinatoria para estudiar sus dinámicas de expresión de manera simultánea para determinar si es posible obtener una mayor cantidad de información, y si esta es útil para el análisis de señales de interés en el entorno celular a través de un método Ratiométrico y el uso de la Entropía de Información, en conjunto con herramientas matemáticas y computacionales. Además, se realizó la comparación de la utilidad de contar con dos o tres reporteros al realizar estos análisis. Se observó que, a través del método Ratiométrico no era posible analizar los tres reporteros de forma adecuada, en comparación al contar con dos reporteros, dado que existían factores extrínsecos que no se podían eliminar con el método. Al realizar el análisis con Entropía de información, se logró reducir la variación extrínseca, siendo mucho mayor la reducción al contar con tres reporteros que al contar con dos. Este método, además, permitió detectar la presencia de inductores, obteniendo información útil.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Biología sintética

Las células en los organismos constituyen sistemas dinámicos complejos que son capaces de procesar información biológica y fisiológica importante, mediante la detección, integración y almacenamiento de señales internas y externas. Este procesamiento de información les permite “tomar” decisiones sobre su diferenciación, migración, interacción con otras células y tasa metabólica, basándose en la variación de su expresión génica (MacDonald y Deans, 2016; Alon, 2007).

El problema que representa la organización y expresión en los organismos puede ser simplificada al considerar las redes génicas como elementos compuestos por subconjuntos de partes o módulos. En este fundamento se basa la biología sintética, que utiliza este enfoque para construir arquitecturas génicas nuevas que pueden realizar funciones complejas. Este campo, aplica paradigmas de la Ingeniería con el fin de construir sistemas predecibles y robustos con nuevas funciones celulares (Bashor *et al.*, 2010; MacDonald y Deans, 2016).

3.2 Partes, dispositivos y sistemas de regulación transcripcional

En biología sintética existe una estructura jerárquica para construir los sistemas de regulación transcripcional, en primer lugar, se encuentran las Partes, que corresponden a secuencias de DNA con una función biológica puntual, por ejemplo, un promotor o una región codificante. Estas partes son sometidas a métodos de caracterización y evaluaciones en distintas condiciones, de forma de que al utilizarlas se pueda predecir su comportamiento a partir de los parámetros obtenidos. Las partes no son utilizadas solas, ya que sólo representan una función biológica, sino que son combinadas para formar los Dispositivos, donde las primeras en conjunto tendrán una función biológica de orden mayor, como la expresión de una proteína, pero con propiedades dinámicas deseadas. Los dispositivos comparten una estructura génica similar entre sí, pero tienen diferentes funciones en base a las partes individuales que lo conforman. De igual forma que con las partes, los dispositivos pueden ser combinados para constituir Sistemas transcripcionales, donde pueden cumplir funciones individuales o interactuar entre ellos,

en el caso de que sus productos génicos tengan influencia sobre la expresión del producto de otro dispositivo. Los sistemas posteriormente son implementados en un Chasis, el cual puede ser una célula procarionte o eucarionte, o bien pueden ser Cell-Free (Noireaux, Bar-Ziv y Libchaber, 2003), que poseen todos los elementos biológicos necesarios para transcribir y traducir los Dispositivos del Sistema, así como también cualquier sustrato enzimático que pudiese ser requerido (Bashor *et al.*, 2010; Baldwin, 2012; MacDonald y Deans, 2016).

3.3 Construcción de Sistemas

Existen variadas técnicas para el ensamblaje de partes, dispositivos y sistemas transcripcionales, las cuales tienen como objetivo común la construcción ordenada de Sistemas de expresión, siguiendo una estructura básica correspondiente a Promotor, Sitio de Unión al Ribosoma (RBS), Región Codificante (CDS) y Terminador.

3.3.1 Ensamblaje *Gibson*

El ensamblaje *Gibson* consiste en el uso de tres enzimas en una sola reacción para el ensamblaje de moléculas de DNA o “Piezas” de gran tamaño. La reacción se produce en un tubo de 0,2 ml a 50°C, donde las enzimas utilizadas son una T5 exonucleasa 5'; una polimerasa de alta fidelidad, que posee una menor tasa de error que las polimerasas utilizadas comúnmente; y una DNA Ligasa *Taq*. Este tipo de ensamblaje permite la unión de fragmentos del orden de los 600 kb tanto para formar moléculas lineales como circularizadas, con una tasa de error baja, siendo esta un error cada 50 moléculas de DNA ensambladas, y al realizarse en un solo paso, simplifica el proceso y disminuye el tiempo invertido, además de evitar el uso de enzimas de restricción. Las moléculas de DNA contienen secuencias homologas en sus extremos, que podrán unirse por complementariedad luego de que la exonucleasa corte en los extremos 5', posteriormente la Polimerasa y la DNA ligasa reparan y unen las moléculas (Gibson *et al.*, 2009). De esta forma la técnica asegura el ensamblaje ordenado tanto de partes como dispositivos dentro de los sistemas.

3.3.2 Clonamiento *Golden Gate*

El Clonamiento *Golden Gate* se basa en el uso de enzimas de restricción de tipo IIS, las cuales cortan fuera del sitio de reconocimiento de la enzima hacia uno de sus lados, esta secuencia es asimétrica (Weber *et al.*, 2011). La orientación de estos sitios determina que fragmentos retienen el sitio de reconocimiento luego de la digestión, lo que permite liberar los fragmentos y el vector aceptor eliminando los sitios de restricción. Los extremos generados por la digestión son diseñados para ser complementarios y son ligados en la misma reacción. El producto de ligación no posee los sitios de reconocimiento, evitando que pueda volver a ser digerido y ligado. Las secuencias que flanquean los fragmentos de DNA a ensamblar pueden ser secuencias de 4 nucleótidos a elección, que presentan homología, por lo que permitirá el ensamblaje ordenado de las partes de interés (Engler y Marillonet, 2014). Uno de los métodos basados en el Clonamiento *Golden Gate* es el Clonamiento Modular o *MoClo* (Weber *et al.*, 2011), por su nombre en inglés, en el cual existen vectores que poseen partes individuales, denominados módulos de nivel 0, que pueden contener Promotores, regiones 5'UTR o RBS, Secuencias Codificantes o CDS y Terminadores, los cuales están flanqueados por los sitios de restricción seguido de una secuencia de 4 nucleótidos, que en el sistema *CIDAR* se nombran con letras desde la A hasta la H (Iverson *et al.*, 2016), permitiendo su ensamblaje en orden en vectores distintos a los primeros, dando paso a las Unidades Transcripcionales (TUs), correspondientes a construcciones de nivel 1. Finalmente, puede realizar un ensamblaje de múltiples TUs en un nuevo vector, dando paso a construcciones de nivel 2 (Weber *et al.*, 2011; Iverson *et al.*, 2016).

3.4 Sistemas de regulación génica y su utilización como biosensores

Dado que los organismos han creado redes génicas que son robustas para responder a los cambios del entorno, resulta interesante poder explorar esta propiedad para crear sistemas programables, para detectar moléculas de interés u otras características del entorno (Cooper y Hall, 1988; MacDonald y Deans, 2016).

Los biosensores son instrumentos analíticos que utilizan componentes biológicos para responder selectivamente a una propiedad de interés. En el caso de contaminantes, por ejemplo, la concentración de estas moléculas será convertida por el dispositivo en

información interpretable por el usuario. Los biosensores transforman información de interés del contexto donde están en otro tipo de información que es accesible al usuario, en este caso, para inferir o medir la presencia y/o nivel de una condición de interés. Esta transformación de la información suele estar basada en la detección de una molécula de interés y producción de una señal o conjunto de señales químicas, ópticas, eléctricas o de otra naturaleza (Cooper y Hall, 1988; Lowe, 1989; Lei, Chen y Mulchandani, 2006). De esta forma mediante el uso de dispositivos génicos es posible programar a las células para que realicen la función de biosensor en gran variedad de campos, desde medicina hasta medioambiente (Cooper y Hall, 1988).

3.4.1 Selectividad de los biosensores

Dentro de los tipos de biosensores, los más comunes corresponden a los sensores directos o específicos, los cuales utilizan componentes internos conocidos a priori, como, por ejemplo, un receptor, para detectar una sustancia puntual, como un contaminante o toxina, y producir una señal que pueda ser caracterizada por el usuario. Estos biosensores suelen construirse mediante el uso de células conteniendo un gen reportero, cuya regulación está dada por la condición de interés (Su *et al.*, 2011), como, por ejemplo, al utilizar el promotor de un gen cuya transcripción es activada por un receptor o un factor de transcripción en respuesta a la presencia de una señal en la muestra analizada. También se ha descrito el uso de enzimas, anticuerpos o receptores inmovilizados en matrices sólidas, que producen una señal medible, como la producción de compuestos coloreados, cambios de concentración de protones, emisión de luz o cambios en el potencial de membrana, frente a la presencia de la condición de estudio (Lei, Chen y Mulchandani, 2006). Avances en el campo de la biología sintética han dado lugar al desarrollo de sensores de orden mayor; capaces de integrar múltiples señales y transformar información compleja del contexto celular en información detectable por el usuario (Tamsir *et al.*, 2011; Nielsen *et al.*, 2016; Benenson, 2012; Siuti *et al.*, 2013).

3.5 Biosensores microbianos

Dentro de los tipos de organismos que se pueden utilizar para construir biosensores se encuentran los microorganismos como bacterias y levaduras, los son capaces de detectar

un amplio rango de sustancias químicas, además de poseer docilidad genética y tolerancia a variaciones grandes de pH y temperatura (Lei, Chen y Mulchandani, 2006). Pueden ser fácilmente manipuladas y adaptadas para detectar diferentes tipos de sustancias, de ellas se puede obtener información tanto cuantitativa como cualitativa robusta, dado que pueden monitorear constantemente su entorno, detectando cambios muy pequeños y reaccionando frente a ellos de forma adecuada (Bousse, 1996; Lei, Chen y Mulchandani, 2006). Los biosensores microbianos han sido ampliamente utilizados para detectar gran variedad de analitos de interés, como metales pesados, aniones, azúcares, drogas, contaminantes orgánicos, entre otros. De esta forma, mediante ingeniería genética, es posible modificar bacterias para sensar diferentes tipos de sustancias, entregando señales medibles (Lei, Chen y Mulchandani, 2006; Reshetilov, Iliasov y Reshetilova, 2010).

3.6 Tipos de señales de detección

Existen diferentes formas de cuantificar la información entregada por los biosensores microbianos, pero existen dos categorías principales que son más utilizadas, correspondientes a biosensores electroquímicos y biosensores ópticos.

Los primeros se basan en la detección de variaciones eléctricas entre las células y las muestras medidas, por ejemplo, utilizando un potencial fijo respecto a un electrodo de referencia, detectando la corriente eléctrica generada al producirse la oxidación o reducción de especies en la superficie de un electrodo distinto al de referencia (Lei, Chen y Mulchandani, 2006; Reshetilov, Iliasov y Reshetilova, 2010; Ji Won Lim *et al.*, 2015).

Las propiedades ópticas de las sustancias como absorción en el espectro UV-Visible, la bio- o quimioluminiscencia, la reflectancia o la fluorescencia son la base de los biosensores ópticos, los cuales ofrecen ventajas como ser compactos y de bajo costo de operación. Los principales biosensores ópticos utilizados son los bioluminiscentes, fluorescentes y colorimétricos. En muchos casos, se utilizan genes reporteros que pueden ser utilizados de forma inducible o constitutiva, dependiendo del tipo de biosensor que se desea construir, sin embargo, también es posible utilizar enzimas que produzcan reacciones de este tipo acopladas con anticuerpos o fijadas en matrices (Lei, Chen y Mulchandani, 2006; Ji Won Lim *et al.*, 2015).

La bioluminiscencia se refiere al proceso de emisión de luz visible en organismos vivos mediante la reacción catalítica de una enzima. Este fenómeno se ha observado en diferentes organismos como bacterias, hongos, insectos y algas, entre otros. Las enzimas que catalizan esta reacción se denominan luciferasas, y sus sustratos, luciferinas, sin embargo, este proceso varía según cada especie (Meighen, 1993). En el caso de los biosensores fluorescentes, se suele utilizar genes reporteros que codifican proteínas fluorescentes como GFP (Green Fluorescent Protein) u otras de distintos colores (Hsiu-Chuan Liao y Ou, 2005), utilizando la intensidad y la dinámica de cambio de esta señal como output para su medición (Hsiu-Chuan Liao y Ou, 2005; Lei, Chen y Mulchandani, 2006; Ji Won Lim *et al.*, 2015).

Para el caso de los biosensores colorimétricos, basta que las células expresen una enzima capaz de producir un compuesto coloreado, ya que este tipo de biosensor se basa en los cambios de color dentro de las células o en el medio donde se encuentran en presencia del analito a detectar (Hsiu-Chuan Liao y Ou, 2005; Lei, Chen y Mulchandani, 2006; Park, Tsai y Chen, 2013).

3.7 Estudio de la dinámica de redes génicas en respuesta a la presencia de compuestos de interés

Si bien, los biosensores ópticos basados en proteínas fluorescentes presentan ventajas frente a sensores de otra naturaleza, su utilización debe ir acompañada de un análisis adecuado para obtener información útil respecto al analito evaluado. En el caso de proteínas fluorescentes acopladas a promotores existen factores que pueden influenciar su transcripción y traducción (Elowitz, 2002). Esto se debe a que, al introducir un sistema o circuito génico en una célula, este depende netamente de los componentes celulares que la última posea para ser transcrito y traducido, los cuales corresponden a RNA polimerasas, ribosomas, tRNAs, entre otros, y no sólo su promotor (Elowitz, 2002; Rudge y Federici, 2016). Cambios en estos parámetros llevará a diferencias en la lectura de la fluorescencia que corresponden a cambios en la expresión del gen. Parte de estos factores, en conjunto con el contexto de medición y el sistema de medición de la expresión, introducen una variación extrínseca a la transcripción dirigida por el promotor. Además, la variación intrínseca de un promotor corresponde a la transcripción dirigida

por este, de forma específica en una serie de contextos o condiciones diferentes (Rudge y Federici, 2016; Figura 2.7.1).

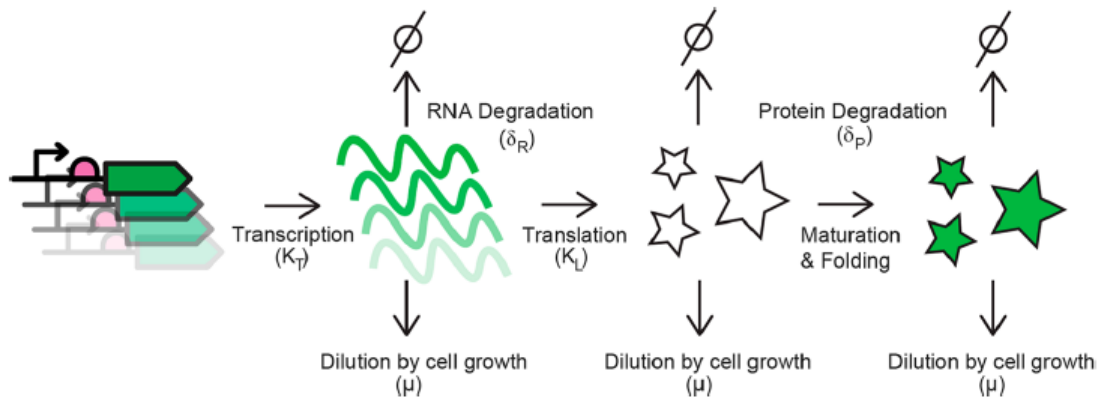


Figura 3.7.1. Pasos para la síntesis de un reportero fluorescente. (De izquierda a derecha) La transcripción es iniciada en una secuencia promotora en cada copia de un gen reportero a una tasa K_T , el mRNA resultante se degrada a una tasa δ_R y diluido por el crecimiento celular (μ), y la traducción de mRNAs a proteínas fluorescentes inmaduras ocurre a una tasa K_L , seguido de plegamiento y maduración a una proteína fluorescente activa. Las proteínas también se degradan (δ_P) y diluidas por el crecimiento celular (μ) (figura tomada desde Rudge et al., 2016).

Es por esto, que se hace necesario contar con métodos de medición confiables, que permitan determinar cómo se comportan las partes y/o sistemas génicos, permitiendo diferenciar los cambios específicos por señales de interés de los cambios globales que pueden ser introducidos por factores externos a la transcripción (Kelly *et al.*, 2009; Rudge y Federici, 2016). En Rudge y Federici, 2016, se desarrolló un método, para abordar el problema de separar las variaciones específicas y globales en la expresión de genes reporteros fluorescentes. Este método utiliza combinaciones de dos reporteros fusionados a promotores, y se encontró que la tasa de producción de los reporteros se correlacionaba fuertemente, dado que se encontraban dentro del mismo contexto celular. Considerando la razón o ratio de las tasas de producción de los reporteros, se redujo la variación extrínseca a menos de un 4%, obteniendo información específica respecto al comportamiento de los promotores estudiados (Figura 2.7.2). Esta razón se consideró intrínseca a los promotores, y representa una medida de su actividad. Sin embargo, en este caso, los promotores utilizados, al ser constitutivos, no respondían de forma específica a señales, pero se sugiere que este método permite diferenciar entre las variaciones por factores intrínsecos y extrínsecos para cualquier tipo de promotor.

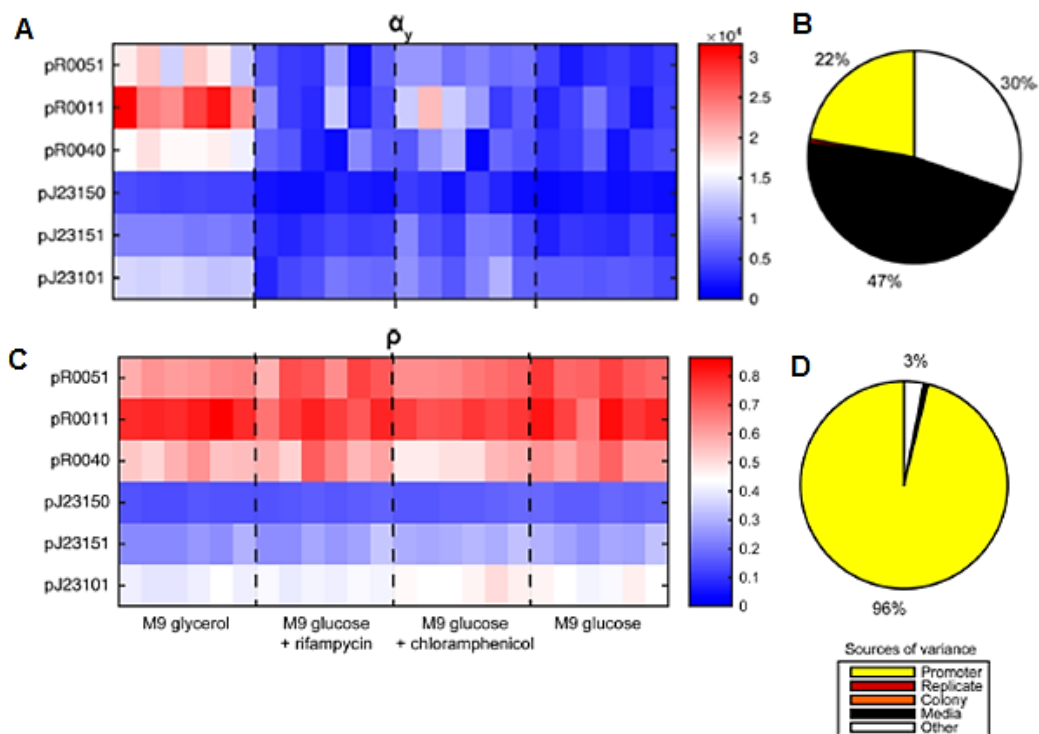


Figura 3.7.2. Método de dos reporteros para extraer información de variabilidad específica del promotor de interés. A) Análisis de expresión de 6 promotores en 4 condiciones diferentes. B) Fuentes de variabilidad en los datos utilizando un reportero. C) Análisis de expresión de los mismos 6 promotores en 4 condiciones diferentes, pero utilizando el método de dos reporteros. D) Fuentes de variabilidad en los datos utilizando dos reporteros (figura modificada desde Rudge y Federici, 2016).

Así, el uso de dos promotores permitió separar la variación extrínseca que afecta la expresión de los reporteros para un solo promotor de interés, utilizando un segundo promotor como referencia, obteniendo de esta forma una medición o característica intrínseca de los promotores que era representativa de la actividad del promotor en las condiciones evaluadas. Dado que se utilizaron tan solo dos reporteros fluorescentes, siendo este método de análisis útil, en el presente trabajo se evaluó la utilidad de introducir un reportero más, realizando el análisis ratiométrico de estos. Considerando que las células poseen redes génicas de regulación robustas, que se comportarán de forma similar cada vez que las células son expuestas a la misma muestra (Bashor *et al.*, 2010; MacDonald y Deans, 2016), al construir redes con más reporteros, se pensó que podrían entregar más información específica sobre la respuesta de los promotores para detectar diferentes señales en el entorno donde se encuentren estas células.

3.8 Teoría de información, Entropía, Entropía condicional e Información mutua

La Teoría de información estudia la cuantificación, almacenaje y comunicación de la información. Fue propuesta por Claude E. Shannon en 1948 para encontrar límites dentro del procesamiento de señales transmitidas. Dentro de los conceptos principales que se tratan en esta teoría se encuentran la Entropía, Entropía conjunta, Entropía condicional e Información mutua (Shannon, 1948; Adami, 2004).

3.8.1 Entropía de información

La entropía de información cuantifica la cantidad de información que existe en un proceso o variable al azar, mediante las probabilidades de los eventos que pueden ocurrir. Si la probabilidad de uno de estos eventos es muy baja, es mayor la cantidad de información que aporta, dado que es poco común. De esta forma entre más al azar o incierto son los eventos dentro del proceso, más información contiene, siendo la entropía una medición de la incertidumbre contenida en el proceso.

Esto se traduce matemáticamente como: $H(X) = -\sum p_i \log_2(p_i)$, siendo la unidad utilizada los bits, dados por el logaritmo utilizado (Shannon, 1948; Adami, 2004). Esta entropía se menciona como entropía independiente en este trabajo, dado que corresponde a la entropía de cada medición por separado.

3.8.2 Entropía conjunta

Al contar con más de una variable al azar, como X e Y, al estar dentro de un mismo contexto, pueden estar relacionadas o no, compartiendo un valor de entropía mayor a la entropía de cada una por separado (Shannon, 1948; Adami, 2004). Esta se define como:

$$H(X, Y) = -\sum_x \sum_y p(x, y) \log_2[p(x, y)] \text{ o } H(X, Y) = H(X) + H(Y).$$

3.8.3 Entropía condicional

Si se tiene más de una variable y tienen dependencia entre ellas, se puede determinar la cantidad de entropía que posee una de las variables al conocer una o más variables del set, lo que reduce la incertidumbre de la primera. La entropía condicional de una variable al conocer otra, por ejemplo, la entropía condicional de X al conocer Y no necesariamente tendrá el mismo valor de la entropía

condicional de Y al conocer X, puesto que la cantidad de información contenida en cada una por separado puede ser distinta y explicar de distinta forma la información contenida en la otra variable (Shannon, 1948; Adami, 2004).

La entropía condicional se define entonces como:

$$H(X|Y) = - \sum p(x, y) \log_2 \left(\frac{p(x, y)}{p(y)} \right) \text{ o } H(X|Y) = H(X, Y) - H(Y).$$

3.8.4 Información mutua

Al poder explicar una variable al conocer otra, estas compartirán una cantidad de información o dependencia entre ellas, la cual se define como información mutua (Shannon, 1948; Adami, 2004).

Matemáticamente esto es: $I(X; Y) = - \sum_x \sum_y p(x, y) \log_2 \left(\frac{p(x, y)}{p(x)p(y)} \right)$.

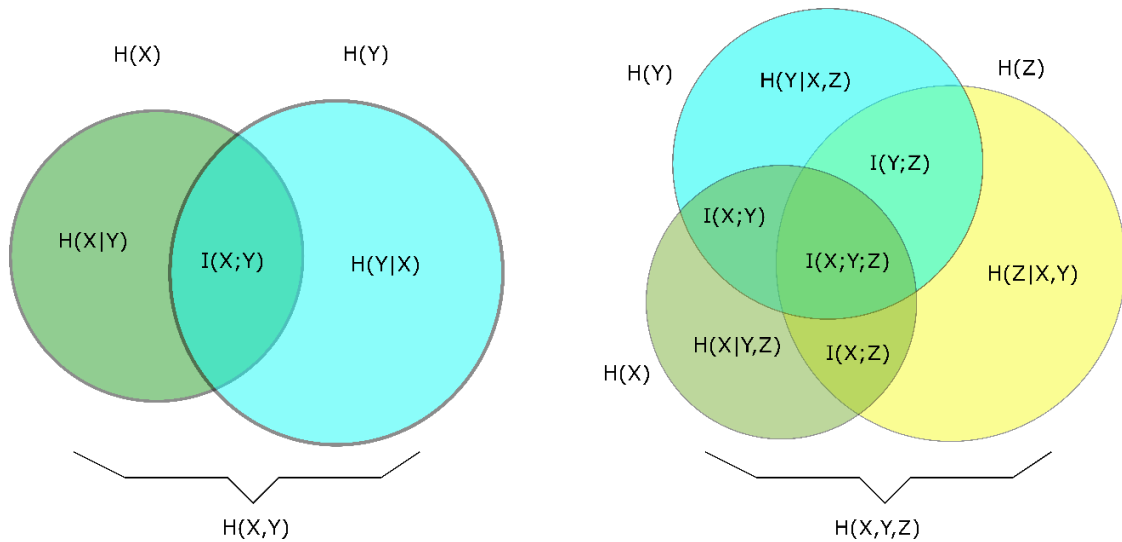


Figura 3.8.1. Diagramas de representación de entropías e información mutua. Se representan las entropías (círculos), entropías condicionales e información mutua al tener dos y tres mediciones. Al tener dos variables, X e Y, (izquierda), estas compartirán una cantidad de información (información mutua, $I(X;Y)$), dado. La entropía de ambas, incluyendo la información mutua representa la entropía conjunta ($H(X,Y)$), y para cada medición su entropía condicional será la diferencia entre la entropía conjunta y la entropía de la otra medición, lo que incluye la información mutua entre ambas como parte de lo sustraído. De forma similar, al contar con tres variables, X, Y, Z (derecha, existirá información mutua entre las tres variables, pero también entre pares de variables. Además, la entropía condicional de cada medición será la diferencia de la entropía conjunta y la entropía de las otras dos mediciones, incluyendo la información mutua de las tres variables y la información mutua entre la medición de interés y cada una de las otras mediciones por separado.

3.9 Hipótesis

Utilizar tres genes reporteros, fusionados a promotores, permite obtener más información sobre las respuestas de los sistemas frente a señales de interés.

3.10 Objetivos

3.10.1 Objetivo general

Evaluar si la utilización de más de dos reporteros otorga mayor y mejor información respecto a señales de interés del contexto celular.

3.10.2 Objetivos específicos

1. Implementar un sistema de ensamblaje de ADN que permita la fabricación combinatorial y eficiente de sistemas génicos.
2. Evaluar si la utilización de dos reporteros de referencia otorga mayor robustez a la información obtenida con un tercer reportero.
3. Evaluar si la utilización de tres reporteros otorga información suficiente para distinguir/analizar más de dos señales de interés.
4. Analizar la información contenida en las mediciones de fluorescencia y densidad con respecto al entorno y las señales.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material biológico

4.1.1 Cepas Bacterianas

Para llevar a cabo la selección de los vectores y Unidades Transcripcionales ensambladas y su propagación para las posteriores purificaciones, se utilizó la cepa de *Escherichia coli* TOP10 One Shot™ quimiocompetentes (Invitrogen), cuyo genotipo es detallado y explicado en el anexo al final de este trabajo. Este genotipo es suficiente para evitar interferencias durante la captación de los vectores por parte de las bacterias y su posterior internalización y expresión (Addgene; Uniprot; Ivasiuk, 1975; Timms *et al.*, 1992; Durfee *et al.*, 2008).

4.2 Diseño experimental

4.2.1 Implementar un sistema de ensamblaje de ADN que permita la fabricación combinatorial y eficiente de sistemas genéticos.

Como se mencionó anteriormente el ensamblaje *Gibson* consiste en el uso de tres enzimas en una sola reacción para el ensamblaje de moléculas de DNA o “Piezas” de gran tamaño. Las reacciones se realizaron en tubos de 0,2 ml a 50°C, donde las enzimas utilizadas fueron una T5 exonucleasa 5’ (Epicentre), una polimerasa de alta fidelidad, correspondiente a la Polimerasa Phusion (Invitrogen) y una DNA Ligasa *Taq* (NEB). La figura 4.2.1.1, describe el proceso de la reacción (Gibson *et al.*, 2009).

Los vectores de destino donde fueron clonadas las Unidades Transcripcionales se denominaron 1X_p15a_Cyan y 1X_SEG_Tur. Para obtenerlos, se realizaron reacciones de PCR con Polimerasa Phusion (Invitrogen), para obtener las piezas que fueron unidas posteriormente por Ensamblaje *Gibson*. Los vectores templado y partidores utilizados se adjuntan en las Tablas 4.2.1.1 y 4.2.1.2, mientras que en la Tabla 4.2.1.3, se indican los componentes de la reacción de PCR. El diseño de los primers para *Gibson* y todas las reacciones del presente trabajo se realizaron tomando en cuenta los siguientes parámetros: largo no mayor a 60 pares de bases;

$T_m \leq 60^\circ\text{C}$; sin más de 4 C o G en los extremos, sobre todo en 3'; $45 \leq \text{CG}\% \leq 60$, siendo ideal 50%. El programa de PCR se realizó en un termociclador, el cual corresponde a 98°C por 30 segundos, luego 35 ciclos con 98°C por 10 segundos, 65°C por 30 segundos y 72°C por 3 minutos. Finalmente 72°C por 7 minutos.

Luego de cada reacción de PCR, los productos se corrieron en un gel de agarosa 2% p/v para las piezas de menos de 3 kb, y en un gel de agarosa 1% p/v para las piezas sobre este tamaño, ambos a 100V por 30 a 45 minutos. Al obtener las bandas de tamaño esperado, se purificaron desde el gel, y se cuantificaron para determinar su concentración y calidad, mediante el lector Synergy HTX (BioTek) y el software Gen5 (BioTek). Para unir las piezas obtenidas mediante Ensamblaje *Gibson*, se determinaron las cantidades equimolares en picomoles de cada pieza, mediante las fórmulas indicadas en la Figura 4.2.1.2, en un volumen final de 4 μl , de los cuales se tomaron 1,5 μl y se mezclaron con 4,5 μl de mix de ensamblaje, cuya composición se adjunta en la Tabla 4.2.1.4. La mezcla se llevó posteriormente a un termociclador, donde el programa utilizado fue 5 minutos a 50°C , luego 60 minutos a 50°C . Una vez terminada la reacción se transformó una alícuota de 50 μl de *Escherichia coli* TOP10 para seleccionar colonias que poseían los vectores deseados.

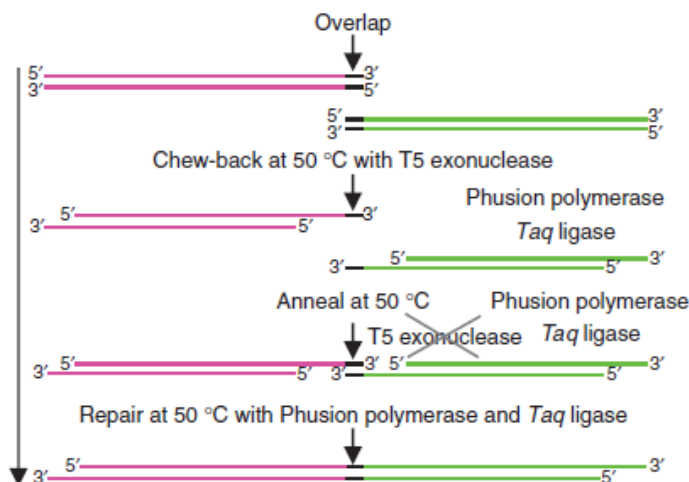


Figura 4.2.1.1. Esquema de reacción isotérmica de Ensamblaje *Gibson*. Todos los procesos indicados ocurren en un mismo tubo de reacción y a la misma temperatura. Primero la T5 Exonucleasa 5' corta los extremos de las moléculas de DNA, luego por complementariedad, se unen los fragmentos y la Polimerasa rellena los espacios, donde finalmente la *Taq* DNA Ligasa repara y une las moléculas (figura tomada desde Gibson et al., 2009).

Tabla 4.2.1.1: “Templados y secuencia de partidores para amplificación de piezas para el vector 1X_p15a_Cyan”

Pieza	Partidores	Secuencias (5'→3')	Templado	Tamaño pieza (bp)
A	U1F	CATTACTCGCATCCATTCTCAGGCTG	pDestBAC	115
	UXR	GGTGAAGGGCTCGGAGTTGTGG		
B	1X_p15aF	GATACATAGATTACCACAACCTCCGAGCCCTTCCACCTACTAGTAGCGGCCGCTGCAGTC	T52V2	700
	pGreenR	TGCGCCGGTTGCATTTCGATTCTCTG		
C	pGreenF	CCTGAGCGAGACGAAATACGCGATC	STDSTD7	3105
	1X_p15aR	GAGACGAGACAGCCTGAGAATGGATGCGAGTAATGTCTAGAAGCGGCCGCGAATTCCAG		

Tabla 4.2.1.2: “Templados y secuencia de partidores para amplificación de piezas para el vector 1X_SEG_Tur”

Pieza	Partidores	Secuencias (5'→3')	Templado	Tamaño pieza (bp)
A	1XCF	GTCTGTCTGTGACAAATTGC	A1XCNL	5056
	sTsVR1	CTAGAAGCGGCCGCGAATTCGACGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATG		
B	sTsVF1	CATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGTCGAATTCGCGGCCGCTTCTAG	TMA1T	1100
	U1R	GAGACGAGACGAGACAGCCTGAG		
C	UXF	CCAGGATACATAGATTACCACAACCTCCG	A1XCNL	5729
	1XCR	GAGGGCAATTGTCTACAGGGTTAAG		
D	U1F	CATTACTCGCATCCATTCTCAGGCTG	pDestBAC	115
	UXR	GGTGAAGGGCTCGGAGTTGTGG		

Tabla 4.2.1.3: “Mix de reacción de PCR para Polimerasa Phusion”

Reactivo	Mix 1X (μl)	1X_p15a_Cyan (3,1X)	1X_SEG_Tur (4,1X)
Buffer 5x	6	18,6	24,6
H ₂ O	20,6	63,86	84,46
dNTPs	0,6	1,86	2,46
Primer forward	0,75	2,325	3,075
Primer reverse	0,75	2,325	3,075
Phusion	0,3	0,93	1,23
Templado	1	-	-
Volumen total	30	-	-

Se realizará una reacción de PCR por cada pieza a amplificar de forma independiente a las demás piezas. Se agregarán 29μl de mix y se agregará 1μl de templado.

$$\mathbf{A} \quad pmol = \frac{\left[\frac{ng}{\mu l} \right] * 1000}{Largo \text{ pieza } (bp) * 650}$$

$$\mathbf{B} \quad Relación \text{ de volumen de una pieza} = \frac{Factor}{pmoles \text{ pieza}}$$

$$\mathbf{C} \quad Vol. \text{ a añadir de una pieza} = \left(\frac{Volumen \text{ final}}{Suma \text{ relación de volumen de piezas}} \right) * Relación \text{ de volumen de la pieza}$$

Figura 4.2.1.2. Fórmulas de cálculo de cantidades equimolares para piezas de Ensamblaje Gibson. A)

Fórmula para el cálculo de picomoles a partir de nanogramos de DNA, donde [ng/μl] corresponde a la concentración de la pieza, 1000 es factor de conversión de nanogramos a picogramos, el largo de pieza corresponde a los pares de bases de la molécula y 650 es el peso molecular promedio de un par de nucleótidos. B) Para determinar el volumen a añadir de cada pieza se necesita sacar la relación entre piezas, para lo cual se determina la relación de volumen de una pieza utilizando un factor, que puede ser 0,01 para piezas de más de 2500bp, 0,03 si la pieza tiene un tamaño entre 200 bp y 2500 bp, o 0,05 si la pieza es menos a 200 bp. C) En esa fórmula, el volumen final corresponde al de la mezcla de piezas, que en este caso será 4 μl, el cual es dividido por la suma de las relaciones de volumen de todas las piezas a ensamblar, esto finalmente se multiplica por la relación de la pieza a agregar.

Tabla 4.2.1.4: “Mix de reacción para Ensamblaje *Gibson*”

Reactivo	Volumen (µl)
Buffer de reacción isotérmica 5X	100
T5 exonucleasa 10U/ µl	2
Polimerasa Phusion 2U/ µl	6,25
Taq DNA ligasa 40 U/ µl	50
H ₂ O	216,75
Volumen	375

Este mix puede ser almacenado en alícuotas de 15 µl hasta por un año (Gibson *et al.*, 2009), se utilizarán 4,5µl para la reacción, más 1,5 µl de la mezcla de cantidades equimolares de las piezas.

Dentro de los vectores de destino mencionados anteriormente, se clonaron las Unidades Transcripcionales indicadas en las Tablas 4.2.1.5 y 4.2.1.6, las cuales están compuestas por un Promotor, un Sitio de Reconocimiento para el Ribosoma (RBS), que será BCD2 o BCD12, una Secuencia Codificante (CDS), correspondiente a RFP o YFP, las cuales son proteínas fluorescentes, y un Terminador, correspondiente a ECK0818 o ECK9600, contenidas en módulos de nivel 0, los sitios de restricción utilizados son reconocidos por la enzima BsaI (NEB), cuya secuencia de reconocimiento es GAGACC/CTCTGG (Iverson *et al.*, 2016). Los promotores son flanqueados por las secuencias A y B, los RBS serán flanqueados por las secuencias B y C, los CDS por las secuencias C y D y los terminadores por las secuencias D y E. Estas secuencias se ubican entre la parte a ensamblar y el sitio de reconocimiento, de forma que, al ser digeridos, los sitios de restricción son eliminados, y permiten el ensamblaje en orden de los módulos, formando las Unidades Transcripcionales, correspondientes al nivel 1, las cuales fueron clonadas dentro de los vectores 12X y 23X dentro de la misma reacción. Las Unidades Transcripcionales se denominaron como TUs 1, para las que están dentro de 12X y TUs 2, para las que están dentro de 23X. Las secuencias de A a E están indicadas en la Tabla 4.2.1.7. Los módulos nivel 0 a utilizar son parte del

kit de *CIDAR MoC/o* depositado en Addgene (Kit #1000000059). Para llevar a cabo las reacciones de Clonamiento, primero las partes fueron diluidas para tener una concentración de 2 ng/μl, luego se calcularon las partes equimolares de cada módulo de nivel 0, para tener aproximadamente 10 fmol de cada parte en un volumen de 10 μl. De esta mezcla se tomaron 7 μl, a los que se agregaron 1 μl de buffer de T4 DNA Ligasa 10X (NEB), 1 μl de T4 DNA Ligasa 10U/μl (NEB) y 1 μl de BsaI 20 U/μl (NEB). La reacción tuvo un volumen final de 10 μl, se llevó en un tubo de 0,2 ml al termociclador, con 20 ciclos de 2 minutos a 37°C, 3 minutos a 16°C. Posteriormente 5 minutos a 50°C y 10 minutos a 80°C. Una vez terminada la reacción se transformó una alícuota de 50 μl de *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen) para seleccionar colonias que poseían los vectores con las Unidades Transcripcionales ensambladas correctamente. En la Figura 4.2.1.3 se indican las ecuaciones para realizar los cálculos de las cantidades equimolares de los módulos.

Tabla 4.2.1.5: “Partes de las Unidades Transcripcionales 1, en el vector 12X”

Promotores	RBS	CDS	terminador	Aceptor nivel 1
A_std_B (TU1.1)	B_BCD2_C	C_RFP_D	D_ECK0818_E	12X
J23106_AB (TU1.2)	B_BCD2_C	C_RFP_D	D_ECK0818_E	12X
J23107_AB (TU1.3)	B_BCD2_C	C_RFP_D	D_ECK0818_E	12X
J23116_AB (TU1.4)	B_BCD2_C	C_RFP_D	D_ECK0818_E	12X
R0040 (pTet)_AB (TU1.5)	B_BCD2_C	C_RFP_D	D_ECK0818_E	12X
R0010 (pLacI)_AB (TU1.6)	B_BCD2_C	C_RFP_D	D_ECK0818_E	12X
pLas81 (TU1.7)	B_BCD2_C	C_RFP_D	D_ECK0818_E	12X
pLux76 (TU1.8)	B_BCD2_C	C_RFP_D	D_ECK0818_E	12X

Tabla 4.2.1.6: “Partes de las Unidades Transcripcionales 2, en el vector 23X”

Promotores	RBS	CDS	terminador	Aceptor nivel 1
A_std_B (TU2.1)	B_BCD12_C	C_YFP_D	D_ECK9600_E	23X
J23106_AB (TU2.2)	B_BCD12_C	C_YFP_D	D_ECK9600_E	23X
J23107_AB (TU2.3)	B_BCD12_C	C_YFP_D	D_ECK9600_E	23X
J23116_AB (TU2.4)	B_BCD12_C	C_YFP_D	D_ECK9600_E	23X
R0040 (pTet)_AB (TU2.5)	B_BCD12_C	C_YFP_D	D_ECK9600_E	23X
R0010 (pLacI)_AB (TU2.6)	B_BCD12_C	C_YFP_D	D_ECK9600_E	23X
pLas81 (TU2.7)	B_BCD12_C	C_YFP_D	D_ECK9600_E	23X
pLux76 (TU2.8)	B_BCD12_C	C_YFP_D	D_ECK9600_E	23X

Tabla 4.2.1.7: “Secuencias flanqueantes para sistema *CIDAR MoClo*”

Tipo de Módulo	Nombre secuencia	Secuencia
Promotor	A	GGAG
	B	TACT
RBS	B	TACT
	C	AATG
CDS	C	AATG
	D	AGGT
Terminador	D	AGGT
	E	GCTT

$$\mathbf{A} \quad fmoles = \left(\frac{[ng/\mu l]}{Largo \text{ módulo (bp)}} \right) * \left(\frac{10^6}{660} \right)$$

$$\mathbf{B} \quad Relación \text{ de volumen} = \frac{fmoles \text{ deseados}}{fmol \text{ módulo}}$$

$$\mathbf{C} \quad Vol. \text{ a añadir} = \left(\frac{volumen \text{ deseado}}{\sum \text{ relación de volumen módulos}} \right) * Relación \text{ de volumen módulo}$$

Figura 4.2.1.3. Fórmulas para cálculos de cantidades equimolares para módulos de nivel 0. A) Fórmula para calcular femtomoles a partir de la concentración de los módulos en nanogramos por microlitro, el largo del módulo corresponde al tamaño del vector en pares de bases, 10^6 corresponde al factor de conversión a femtogramos y 660 es el peso molecular promedio que tiene un par de nucleótidos. B) Para determinar el volumen a añadir de cada pieza se necesita sacar la relación entre piezas, para lo cual se determina la relación de volumen de una pieza utilizando la cantidad de femtomoles deseados y se divide en los femtomoles calculados en A) para cada módulo. C) En esa fórmula, el volumen deseado corresponde al de la mezcla de módulos, que en este caso será 10 μ l, el cual es dividido por la suma de las relaciones de volumen de todas las piezas a ensamblar, esto finalmente se multiplica por la relación de la pieza a agregar.

Una vez obtenidas las Unidades Transcripcionales, se procedió a clonaras según las combinaciones indicadas en la Tabla 4.2.1.8, en el vector 1X_p15a_Cyan. Dado que las TU1 comparten las mismas secuencias entre si excepto el promotor, y de igual forma sucede entre las TU2, se indica la combinación según sus promotores en la Tabla 4.2.1.8.

Para construir estos vectores, se realizó ensamblaje *Gibson*, pero con la utilización de Secuencias Nucleotídicas Únicas o UNSes, las cuales permiten realizar el ensamblaje de forma ordenada, la Figura 4.2.1.4 ejemplifica el uso de UNSes en el ensamblaje de vectores (Torella *et al.*, 2014; Torella *et al.*, 2014). Ya que los vectores de destino poseen U1 y UX, las TU1 poseen U1 y U2, y las TU2 poseen U2 y UX, se pudo amplificar mediante PCR con Polimerasa Phusion (Invitrogen), como se realizó para las piezas de los vectores de destino mencionados anteriormente. Las UNSes y los partidores utilizados se indican en la Tabla 4.2.1.9. Una vez obtenidas las piezas, se cuantificaron mediante el equipo Synergy HTX (BioTek) y el software Gen5 (BioTek), para determinar la concentración y calidad

del DNA. Las reacciones de ensamblaje *Gibson* se realizaron de igual forma que para los vectores de destino. Las UNSes utilizadas y su diseño son las descritas en Torella *et al.*, 2014.

Tabla 4.2.1.8: “Combinaciones de TUs para el vector 1X_p15a_Cyan”

	2.1 (J23101)	2.3 (J23107)	2.5(R0040)	2.6 (R0010)	2.7 (pLas81)
1.1(J23101)	J23101/J23101	-	-	-	-
1.2 (J23106)	J23106/J23101	J23106/J23107	-	J23106/R0010	J23106/pLas81
1.4 (J23116)	J23116/J23101	J23116/J23107	-	J23116/R0010	J23116/pLas81
1.5 (R0040)	R0040/J23101	R0040/J23107	-	R0040/R0010	R0040/pLas81
1.8 (pLux76)	pLux76/J23101	pLux76/J23107	pLux76/R0040	pLux76/R0010	pLux76/pLas81

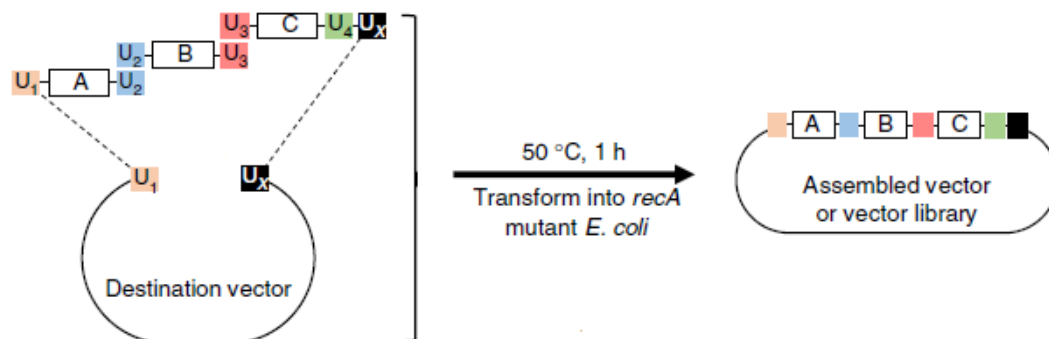


Figura 4.2.1.4. Ensamblaje Gibson mediante utilización de UNSes. Cada parte por ensamblar estará flanqueada por 2 UNSes, las cuales al ser digeridas por la exonucleasa 5' T5, quedarán con extremos que serán complementarios a la UNS de la parte siguiente (Gibson *et al.*, 2009; figura modificada de Torella *et al.*, 2014).

Tabla 4.2.1.9: “Secuencia de UNSes utilizadas y partidores para amplificación piezas”

Templado piezas	UNSeS	Secuencias UNSes (5'→3')	Partidores
1X_p15a_Cyan	U1	CATTACTCGCATCCATTCTCAGGCTGTCTCGTCTCGTCTC	U1R
	UX	CCAGGATACATAGATTACCACAACCTCCGAGCCCTTCCACC	UXF
TUs 1	U1	CATTACTCGCATCCATTCTCAGGCTGTCTCGTCTCGTCTC	U1F
	U2	GCTGGGAGTTTCGTAGACGGAAACAAACGCAGAATCCAAGC	U2R
TUs 2	U2	GCTGGGAGTTTCGTAGACGGAAACAAACGCAGAATCCAAGC	U2F
	UX	CCAGGATACATAGATTACCACAACCTCCGAGCCCTTCCACC	UXR

Posteriormente se construyó un vector accesorio utilizando el vector de destino 1XColE1. Este vector accesorio contiene las proteínas de regulación de respuesta LacI y TetR, que se utilizaron para analizar la respuesta a las señales de estudio Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y anhidrotetraciclina (aTc) respectivamente. El CDS de TetR, así como su promotor, RBS y terminador, existen como piezas level 0 para Golden Gate en el laboratorio y se detallan en la Tabla 4.2.1.10. De esta forma TetR es ensamblado como Unidad Transcripcional y luego mediante Gibson es introducido en 1XColE1. LacI se expresa constitutivamente en 1XColE1, y este además posee el origen de replicación ColE1, que es compatible con el origen de replicación p15a y OriV de los vectores finales, y el gen de resistencia a Carbenicilina. Los primers y detalles de ensamblaje se detallan en tabla 4.2.1.11.

Tabla 4.2.1.10: “Partes de unidad transcripcional de TetR”

Promotores	RBS	CDS	terminador	Aceptor nivel 1
A_std_B	B_BCD2_C	C_TetR_D	D_ECK0818_E	12X

Tabla 4.2.1.11: “Secuencia de UNSes utilizadas y partidores para amplificación piezas del vector accesorio”

Templado piezas	UNSeS	Secuencias UNSes (5'→3')	Partidores
1XColE1	U1	CATTACTCGCATCCATTCTCAGGCTGTCTCGTCTCGTCTC	U1R
	UX	CCAGGATACATAGATTACCACAACCTCCGAGCCCTTCCACC	UXF
TetR	U1	CATTACTCGCATCCATTCTCAGGCTGTCTCGTCTCGTCTC	U1F
	UX	GCTGGGAGTTCTGTAGACGGAAACAAACGCAGAATCCAAGC	UXR

Los partidores se utilizaron para la amplificación de las partes para realizar el ensamblaje del vector accesorio mediante Gibson.

4.2.2 Purificación de piezas de ADN para ensamblaje desde gel

Una vez obtenidas las piezas para los vectores de destino y correrlos en los geles indicados, las bandas obtenidas se purificaron mediante el uso del Kit Wizard® Plus SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), utilizando el Quick Protocol especificado por el proveedor. Posteriormente se determinó la calidad y concentración de las piezas mediante el lector Synergy HTX (BioTek) y el software Gen5 (BioTek), para realizar posteriormente el cálculo de las cantidades equimolares de estas. Las partes purificadas se almacenaron a -20°C.

4.2.3 Transformación de bacterias

Para realizar la selección y propagación de vectores, se transformaron células de *Escherichia coli* TOP10 One Shot™ quimiocompetentes (Invitrogen), las cuales se almacenan a -80°C en tubos de 0,6 ml, en alícuotas de 50 µl con buffer CCMB80. Estas se dejaron descongelar por 15 a 20 minutos en hielo, para posteriormente agregar el DNA a incorporar en el tubo. Para el caso del ensamblaje *Gibson* se usó todo el contenido de la reacción, mientras que para las reacciones de *Golden Gate* se usaron 5 µl. Una vez agregado el DNA se dejaron reposar por 20 a 30 minutos en hielo, para posteriormente dar un shock térmico a 42°C por 1 minuto en baño termorregulado. Luego se llevó al hielo inmediatamente por 2 a 5 minutos y se agregaron 250 µl de medio LB líquido bajo mechero. Se dejaron los tubos con

bacterias 1 hora a 37°C y 250 rpm de agitación. Luego se tomaron 100 µl de bacterias y se sembraron bajo mechero en placas de LB agar con antibiótico, el cual se eligió según el vector a seleccionar. Se dejaron crecer durante 16 horas o durante la noche.

4.2.4 Selección colonias positivas de bacterias transformadas, stocks en glicerol y cultivos líquidos

Luego de realizar los cultivos en los medios sólidos con antibióticos, 2 a 3 colonias obtenidas fueron picadas para realizar PCR de colonias con la enzima Polimerasa GoTaq (Promega), donde se utilizaron partidores para regiones puntuales de las construcciones, a modo de verificar la presencia de los vectores y que estos contenían los elementos deseados. El mix de reacción de PCR se adjunta en la Tabla 4.2.4.1, el programa que utilizado en el termociclador fue el siguiente: 95°C por 10 minutos, luego 35 ciclos con 95°C por 30 segundos, 55°-60°C por 30 segundos, 72°C por 1:30 minutos. Finalmente 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa 2% por 30-45 minutos a 100V. Si se obtenían bandas de los tamaños esperados, las colonias se consideraron positivas, y se realizaron cultivos de estas en 5 ml de LB líquido con el antibiótico correspondiente, se dejaron crecer durante la noche, para al día siguiente hacer un stock en glicerol, donde se agregaron 500 µl de medio líquido con bacterias y 500µl de glicerol 50% en tubos criogénicos (Invitrogen). Se almacenaron a -80°C.

Tabla 4.2.4.1: “Mix Polimerasa Gotaq”

Reactivo	Mix 1X (µl)
Green Buffer Gotaq 5X	2
H ₂ O	4,45
MgCl ₂ 25Mm	1,6
DNTPs	0,2
Primer forward	0,25
Primer reverse	0,25
Enzima Gotaq	0,25
Templado	1

4.2.5 Extracción y purificación de plásmidos utilizando un kit comercial

Una vez realizado el stock en glicerol, el resto del cultivo se utilizó para extraer y purificar los plásmidos de interés mediante el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Los plásmidos obtenidos se cuantificaron mediante el equipo Synergy HTX (BioTek) y el software Gen5 (BioTek), para determinar la concentración y calidad del DNA. Posteriormente, se almacenaron a -20°C.

4.2.6 Evaluar si la utilización de dos reporteros de referencia otorga mayor robustez a la información obtenida con un tercer reportero

Una vez obtenidas todas las combinaciones de TUs en los vectores de destino, se realizaron ensayos de crecimiento en medio M9 para las colonias que contenían estos vectores, para realizar mediciones de densidad óptica y fluorescencia, en placas de 96 pocillos estériles negras (Thermo). Para evaluar la influencia de diferentes fuentes de carbono, se dividió la placa en dos regiones mayores, una para mediciones en medio M9 suplementado con glucosa 0,4% y una para las mediciones en medio M9 suplementado con glicerol 0,2%. Dentro de cada región mayor se delimitaron 4 regiones de 10 pocillos cada una para los vectores evaluados, que fueron cuatro por ensayo, más dos columnas con 4 pocillos cada una para los controles de medio M9 solo y los controles de medio M9 con bacterias sin transformar para cada condición. Para cada ensayo se efectuaron mediciones de densidad óptica y de intensidad de fluorescencia para los reporteros en el equipo Synergy HTX (BioTek) y se registraron con el software Gen5 (BioTek). Los ensayos se realizaron durante 24 horas, con agitación constante, a 37°C y las mediciones se realizaron cada 15 minutos, siendo cada ensayo repetido 3 veces. Dado que los vectores de destino poseen CFP, en primera instancia se utilizaron estos como referencia en los ensayos para normalizar las mediciones de los otros dos reporteros (Kelly *et al.*, 2009; Rudge *et al.*, 2016), ya que estaba siempre fusionado al mismo promotor, de forma que solo cambiaban los promotores de los otros dos reporteros dentro de las TUs. La composición del medio M9 y los vectores evaluados por ensayos se detallan en las Tablas 4.2.6.1 y 4.2.6.2. La

distribución de las colonias en los ensayos se especifica en el Anexo (Fig. Anexo 4).

Posteriormente, en base a los mismos datos obtenidos de estos ensayos, se evaluó el uso de otro de reporteros (YFP) como referencias en vez de CFP.

Tabla 4.2.6.1: “Composición medio M9 para ensayos de crecimiento”

Reactivo	Concentración stock	Volumen necesario (25 ml)
Agua destilada estéril	-	13,75 ml
MgSO ₄ * 7H ₂ O	1M	50µl
Sales M9*	5X	5 ml
Glucosa	20% v/v	250 µl
Glicerol	20% v/v	125 µl
CaCl ₂	1M	2,5 µl
Casaminoácidos	1% p/v	5 ml

*Las sales M9 5X están compuestas por: Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, NH₄Cl. Los componentes deben ser agregados en este orden y se debe completar con agua destilada estéril hasta 25 ml totales. Los volúmenes de Glucosa y Glicerol son para obtener concentraciones finales de 0,4% y 0,2% respectivamente. El medio M9 debe ser preparado en el momento a utilizar.

Tabla 4.2.6.2: “Vectores evaluados por ensayo”

Ensayo	Vectores			
1	1.1-2.1	1.8-2.1	1.8-2.5	1.8-2.6
2	1.5-2.1	1.5-2.3	1.5-2.6	1.5-2.7
3	1.8-2.1	1.8-2.3	1.8-2.6	1.8-2.7
4	1.2-2.1	1.2-2.3	1.2-2.6	1.2-2.7
5	1.2-2.6	1.5-2.3	1.5-2.6	

* 1.1: J23101, 1.2: J23106, 1.4: J23116, 1.5: R0040(pTet), 1.8: pLux76, 2.1: J23101, 2.3: J23107, 2.5: R0040(pTet), 2.6: R0010(pLacI), 2.7: pLas81.

Para realizar los ensayos se dejaron cultivos líquidos de las colonias en ambas condiciones, medio M9 con glucosa 0,4% o glicerol 0,2%, durante la noche. Al día

siguiente se preparó 25 mL de M9 con glucosa y 25 mL con glicerol y se distribuyeron 1996 μ L de medio en tubos de 2 mL, donde se agregaban 2 μ L de antibiótico y 2 μ L el cultivo de bacterias correspondiente. Luego se agregaron 200 μ L de las mezclas a los pocillos de las placas, esta luego se cerró con parafilm y se llevó al lector.

4.2.7 Evaluar si la utilización de tres reporteros otorga información suficiente para distinguir/analizar más de dos señales de interés.

Para este objetivo los ensayos realizados se realizaron con colonias cotransformadas con el vector accesorio junto a uno de tres posibles plásmidos de tres reporteros, que contienen el promotor pTet (1.5-R0040), el promotor pLacI(2.6-R0010) o ambos, estos se indican en la Tabla 3.2.6.2. El vector accesorio produce las proteínas reguladoras que responden a las señales, afectando los promotores en el plásmido reportero. Las señales utilizadas fueron anhidrotetraciclina o aTc que interactúa con la proteína TetR y el promotor pTet, e IPTG, que interactúa con la proteína LacI y el promotor pLacI. La forma en que interactúan los inductores con los vectores se describe en el Anexo (Fig. Anexo 5)

Se realizó un ensayo para determinar el rango de concentraciones donde se podía observar influencia de las señales sobre el sistema. Para esto, en una placa de 96 pocillos estéril negra (Thermo) se distribuyeron por duplicado diferentes concentraciones de aTc e IPTG, por separado de menor a mayor concentración. Los vectores y señales con sus concentraciones evaluados se indican en la tabla 4.2.7.1. Se incluyeron 4 controles, medio M9 solo, medio M9 con la concentración máxima de señales, bacterias sin transformar solas y bacterias sin transformar con la concentración máxima de señales. El ensayo se repitió 3 veces, midiendo densidad óptica e intensidad de fluorescencia durante 24 horas, con agitación constante, a 37°C, realizando las mediciones cada 15 minutos.

Tabla 4.2.7.1: “Concentraciones de señales evaluadas”

Vectores	Señal	Concentraciones
1.2-2.6	IPTG	1000, 200, 150, 100, 70, 50,
1.5-2.6		40, 30, 20, 10
1.5-2.3	aTc	500, 250, 200, 100, 80, 60, 50,
1.5-2.6		30, 20, 10

*Las concentraciones de IPTG están en micro molar, y las concentraciones de aTc en nanogramos por mililitros, estos valores corresponden a la concentración final en el pocillo.

4.2.8 Analizar la información contenida en las mediciones de fluorescencia y densidad con respecto al entorno y las señales

Con los datos obtenidos en los ensayos mencionados anteriormente, se procedió a realizar el análisis respecto a la síntesis de las proteínas fluorescentes, de forma de poder correlacionar esta información a la actividad de los promotores y el crecimiento de las células en cada caso. En primera instancia de manera similar al trabajo realizado por Rudge y Federici, 2016, se analizaron los datos obtenidos mediante el método ratiométrico para reducir la variación extrínseca y obtener características intrínsecas de los promotores.

Todos los cálculos y gráficos de este trabajo se realizaron mediante el uso del lenguaje de programación Python y los diversos paquetes que posee para el análisis de datos. Se utilizó la aplicación Jupyter para escribir el código de los diferentes análisis a través de “Notebooks”, los cuales fueron almacenados en un repositorio en la plataforma GitHub en **github.com/macams/Biosensores**.

Además, en el laboratorio Ambrosio Valdés, desarrolló una base de datos para almacenar y acceder fácilmente a los datos de todos los experimentos realizados por los integrantes del laboratorio. Para poder almacenar los datos, a los archivos entregados por el lector de placas se le agregaban hojas donde se especificaba en tablas la cepa bacteriana, el medio utilizado, el plásmido que posee la colonia y si tiene o no inductores para cada pocillo de la placa. Así, a través de la base de datos se pudo acceder a los archivos y datos de los ensayos realizados solo para este trabajo, independiente de otros experimentos realizados en el laboratorio. El

código de esta base de datos se puede encontrar en github.com/SynBioUC/flapjack.

Para realizar el método ratiométrico, en primer lugar, se utilizó una función de ajuste para los datos de densidad óptica a modo de encontrar la de datos dentro de la fase exponencial de crecimiento. El modelo utilizado fue el de Gompertz, cuya ecuación es $y = A \exp \left\{ -\exp \left[\frac{\mu_m * e}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$. Los parámetros de esta ecuación se definen como $y = \ln \left[\frac{N}{N_0} \right]$, correspondiente al crecimiento relativo de la colonia, A es el crecimiento máximo alcanzado, λ el tiempo de la fase lag, t es el tiempo, μ_m es el máximo de la tasa de crecimiento y $e = \exp(1)$. Estos parámetros fueron determinados mediante una función definida por un código para los promedios por réplica de ensayo de las colonias, por lo que los parámetros eran específicos de cada promedio y plásmido.

Con los valores determinados se calculó el tiempo donde inicia la fase exponencial ($t_m = \left(\frac{A}{\mu_m * \exp(1)} \right)$), el tiempo de duplicación de las colonias ($t_2 = \frac{\ln 2}{\mu_m}$), el tiempo que se extendía la fase exponencial, que corresponde al tiempo de duplicación por 2, si la colonia crecía en glucosa, o 2,5 si crecía en glicerol, siendo el tiempo final de la fase exponencial la suma de t_m y el tiempo de extensión. De esta forma se obtuvo la posición de los datos dentro de la fase exponencial.

Una vez obtenida la ubicación de los datos, se procedió a graficar los datos de fluorescencia respecto a la absorbancia para cada promedio de réplica. En estos gráficos se seleccionaron los datos dentro de la fase exponencial y se les realizó un ajuste lineal mediante una función definida dentro de Python, la pendiente obtenida mediante esta corresponde a α_p , que posteriormente fueron graficados por proteína fluorescente para su comparación separados por réplica de ensayo y condición. Posteriormente se calcularon los valores de ρ_p , mediante la división de α_r y α_y por α_c , y de α_r por α_y . Estos también fueron graficados por proteína fluorescente para ser comparados por réplica de ensayo y condición.

Para determinar la influencia de diferentes factores sobre la variabilidad de α_p y ρ_p , se realizaron pruebas de análisis de varianza (ANOVA) para los valores de estos

términos mediante el software IBM SPSS Statistics 25 (IBM) (Nivel de significancia $\alpha=0,05$). Los factores definidos fueron plásmido (referente al promotor que dirige al reportero), medio, por las condiciones utilizadas, réplica, referente a las réplicas de ensayo y otros, puesto que existen factores que afectan a los reporteros que no son cuantificables fácilmente mediante los experimentos realizados.

Separado del análisis anterior, se procedió a realizar los cálculos para determinar los valores de entropía independiente ($H(x)$) y entropías condicionales de los datos. Para esto también se utilizó la base de datos, accediendo a todas las réplicas al mismo tiempo, y utilizándolas para hacer los cálculos.

Para determinar los valores de entropía independiente se determinó la variación de los datos en el tiempo mediante la diferencia entre los datos y su antecesor, luego estos datos calculados se graficaron en histogramas mediante funciones definidas en códigos, a modo de obtener la probabilidad de los datos y estas probabilidades se utilizaron para el cálculo de entropía ($H(x) = -\sum p_i \log_2(p_i)$) y de las entropías condicionales ($H(x|y) = H(x, y) - H(y)$). Estas últimas se graficaron respecto a las entropías independientes de cada proteína fluorescente como porcentajes, siendo comparadas las diferentes entropías condicionales por cada condición (glucosa o glicerol) y posteriormente por la presencia o no de inductores, para el caso de las colonias cotransformadas. Por último, se realizaron pruebas ANOVA para determinar la influencia de diferentes factores sobre la variabilidad de los datos de una de las entropías condicionales de los vectores con inductores (Nivel de significancia $\alpha=0,05$). Los factores utilizados fueron plásmido (referente al promotor que dirige al reportero); medio, pues se compararon los datos en glucosa y glicerol, y con glucosa en el caso de los evaluados con inductores; la presencia de inductores y otros factores, puesto que pueden existir factores que no son medibles fácilmente mediante los experimentos realizados.

De este modo, mediante el uso del método de análisis ratiométrico y los conceptos de la Teoría de información, se evaluó por separado la utilidad del uso de vectores de tres reporteros para la obtención de información útil y robusta al utilizar biosensores de este tipo. Esto, ya que inicialmente se necesita obtener mediciones

o características intrínsecas para caracterizar el comportamiento de las partes utilizadas con el fin de tener métodos de análisis más precisos para interpretar la información de cualquier biosensor que utilice reporteros fluorescentes.

5. RESULTADOS

5.1 Librería de vectores

Mediante los métodos de ensamblaje y clonamiento utilizados se construyó una librería de un total de 37 vectores, las secuencias de estos se pueden encontrar en el sitio de OSF (osf.io/pd7xc) del proyecto dentro de la carpeta de Google Drive denominada como **Biosensores**. En la Tabla 5.1.1 se especifica el nombre, el método de ensamblaje y la ubicación de los vectores.

Tabla 5.1.1: “Librerías de vectores construidos”

Nombre vector	Método de construcción	Ubicación en Google Drive
1X_p15a_Cyan	Gibson	Construcciones/Vectores aceptores finales
1X_SEG_Tur	Gibson	Construcciones/Vectores aceptores finales
TU 1.1 J23101 (pStd)-BCD2-RFP-ECK0818_12X	Golden Gate (MoClo)	Construcciones/Unidades Transcripcionales
TU 1.2 J23106-BCD2-RFP-ECK0818_12X	Golden Gate (MoClo)	Construcciones/Unidades Transcripcionales
TU 1.3 J23107-BCD2-RFP-ECK0818_12X	Golden Gate (MoClo)	Construcciones/Unidades Transcripcionales
TU 1.4 J23116-BCD2-RFP-ECK0818_12X	Golden Gate (MoClo)	Construcciones/Unidades Transcripcionales
TU 1.5 R0040 (pTet)-BCD2-RFP-ECK0818_12X	Golden Gate (MoClo)	Construcciones/Unidades Transcripcionales
TU 1.6 R0010 (pLacI)-BCD2-RFP-ECK0818_12X	Golden Gate (MoClo)	Construcciones/Unidades Transcripcionales
TU 1.7 pLas81-BCD2-RFP-ECK0818_12X	Golden Gate (MoClo)	Construcciones/Unidades Transcripcionales
TU 1.8 pLux76-BCD2-RFP-ECK0818_12X	Golden Gate (MoClo)	Construcciones/Unidades Transcripcionales
TU 2.1 J23101 (pStd)-BCD12-YFP-ECK9600_23X	Golden Gate (MoClo)	Construcciones/Unidades Transcripcionales
TU 2.2 J23106-BCD12-YFP-ECK9600_23X	Golden Gate (MoClo)	Construcciones/Unidades Transcripcionales
TU 2.3 J23107-BCD12-YFP-ECK9600_23X	Golden Gate (MoClo)	Construcciones/Unidades Transcripcionales

TU 2.4 J23116-BCD12-YFP-ECK9600_23X	Golden Gate (MoClo)	Construcciones/Unidades Transcripcionales
TU 2.5 R0040 (pTet)-BCD12-YFP-ECK9600_23X	Golden Gate (MoClo)	Construcciones/Unidades Transcripcionales
TU 2.6 R0010 (pLacI)-BCD12-YFP-ECK9600_23X	Golden Gate (MoClo)	Construcciones/Unidades Transcripcionales
TU 2.7 pLas81-BCD12-YFP-ECK9600_23X	Golden Gate (MoClo)	Construcciones/Unidades Transcripcionales
TU 2.8 pLux76-BCD12-YFP-ECK9600_23X	Golden Gate (MoClo)	Construcciones/Unidades Transcripcionales
J23101_RFP-J23101_YFP-J23101_CFP	Gibson	Construcciones/Vectores RFP-YFP-CFP
J23106_RFP-J23101_YFP-J23101_CFP	Gibson	Construcciones/Vectores RFP-YFP-CFP
J23106_RFP-J23107_YFP-J23101_CFP	Gibson	Construcciones/Vectores RFP-YFP-CFP
J23106_RFP-pLacI_YFP-J23101_CFP	Gibson	Construcciones/Vectores RFP-YFP-CFP
J23106_RFP-pLas81_YFP-J23101_CFP	Gibson	Construcciones/Vectores RFP-YFP-CFP
J23116_RFP-J23101_YFP-J23101_CFP	Gibson	Construcciones/Vectores RFP-YFP-CFP
J23116_RFP-J23107_YFP-J23101_CFP	Gibson	Construcciones/Vectores RFP-YFP-CFP
J23116_RFP-pLacI_YFP-J23101_CFP	Gibson	Construcciones/Vectores RFP-YFP-CFP
J23116_RFP-pLas81_YFP-J23101_CFP	Gibson	Construcciones/Vectores RFP-YFP-CFP
pLux76_RFP-J23101_YFP-J23101_CFP	Gibson	Construcciones/Vectores RFP-YFP-CFP
pLux76_RFP-J23107_YFP-J23101_CFP	Gibson	Construcciones/Vectores RFP-YFP-CFP
pLux76_RFP-pLacI_YFP-J23101_CFP	Gibson	Construcciones/Vectores RFP-YFP-CFP
pLux76_RFP-pLas81_YFP-J23101_CFP	Gibson	Construcciones/Vectores RFP-YFP-CFP

pLux76_RFP-pTet_YFP-J23101_CFP	Gibson	Construcciones/Vectores RFP-YFP-CFP
pTet_RFP-J23101_YFP-J23101_CFP	Gibson	Construcciones/Vectores RFP-YFP-CFP
pTet_RFP-J23107_YFP-J23101_CFP	Gibson	Construcciones/Vectores RFP-YFP-CFP
pTet_RFP-pLacI_YFP-J23101_CFP	Gibson	Construcciones/Vectores RFP-YFP-CFP
pTet_RFP-pLas81_YFP-J23101_CFP	Gibson	Construcciones/Vectores RFP-YFP-CFP
J23101-B0032m-LasR-B0015_34X	Golden Gate (MoClo)	Construcciones/Vector accesorio
J23101-BCD2-C0040 (TetR)-ECK0818_12X	Golden Gate (MoClo)	Construcciones/Vector accesorio
TetR- 1XColE1	Gibson	Construcciones/Vector accesorio

Se obtuvieron los dos vectores de destino, sin embargo, solo se utilizó 1X_p15a_Cyan para el ensamblaje de los vectores de tres reporteros, obteniendo 18 vectores de este tipo. De estos últimos, se utilizaron 14 para realizar los ensayos de crecimiento en medio M9 con glucosa 0,4% o glicerol 0,2% y de estos 14, tres fueron utilizados también para los ensayos con inductores y además se obtuvo el vector accesorio que fue contrasformado con estos últimos.

Todos los datos obtenidos para estos vectores de los ensayos de crecimiento se almacenaron en la base de datos creada en el laboratorio.

5.2 Los valores de α_p son diferentes entre condiciones y están influenciados por factores extrínsecos

Una vez obtenidos los datos de los ensayos de crecimiento, se procedió a realizar ajustes para las densidades ópticas de los promedios de réplicas por ensayo utilizando el modelo de Gompertz (Zwietering *et al.*, 1990), el cual entregó curvas de ajuste que coinciden con las curvas de densidad óptica respecto al tiempo de los datos crudos (Fig. anexo 6), entregando parámetros suficientes para determinar la fase exponencial de los datos mediante los cálculos descritos en

4.2.8, los cuales entregan los tiempos a los cuales inicia y termina la fase exponencial. Sin embargo, fue necesario seleccionar los datos dentro de la fase exponencial de forma manual y específica para cada promedio de réplica para utilizarlos, pues en cada caso la fase exponencial tenía una duración y ubicación en el tiempo distinta, dificultando utilizar una función general para todas densidades ópticas de las colonias. Posteriormente se graficaron los datos de fluorescencia respecto a densidad óptica, seleccionando los datos ubicados dentro de la fase exponencial determinada previamente y se realizó un ajuste lineal (Fig. Anexo 7). En estos gráficos se observó que los datos dentro de la fase exponencial tenían una relación proporcional, dado que no se desviaban en gran medida de la línea de regresión, obteniendo ecuaciones de recta adecuadas ($R^2 \approx 0,9$).

Las pendientes obtenidas de estos ajustes lineales corresponden a los valores de α_p , los cuales fueron graficados para cada condición y réplica (Figs. Anexo 8-11; Fig. 5.2.1, A-C), observando que los valores de α_p en glicerol son mucho mayores en todas las réplicas que su contraparte en glucosa, además, son similares por condición, pero entre condiciones son diferentes, esto coincide con lo descrito en el trabajo previo (Rudge y Federici, 2016). Las pruebas ANOVA para los diferentes factores considerados muestran que la variación no es solo por el plásmido utilizado (referente al promotor que dirige al reportero), sino que se incluye el medio y otros factores, siendo el de menor incidencia la réplica de ensayo para todos los α_p . Para el caso de CFP la mayoría de la variación es debido al medio utilizado (73,06%) y otros factores no especificados (20,95%), mientras que para RFP el plásmido utilizado representa el 20,99% y para YFP el 30,51%, el medio representa el 44,16% y el 41,20% de la variación respectivamente y otros factores no especificados corresponden al 31,82% y 26,44% respectivamente (Fig. 4.2.1, D-F).

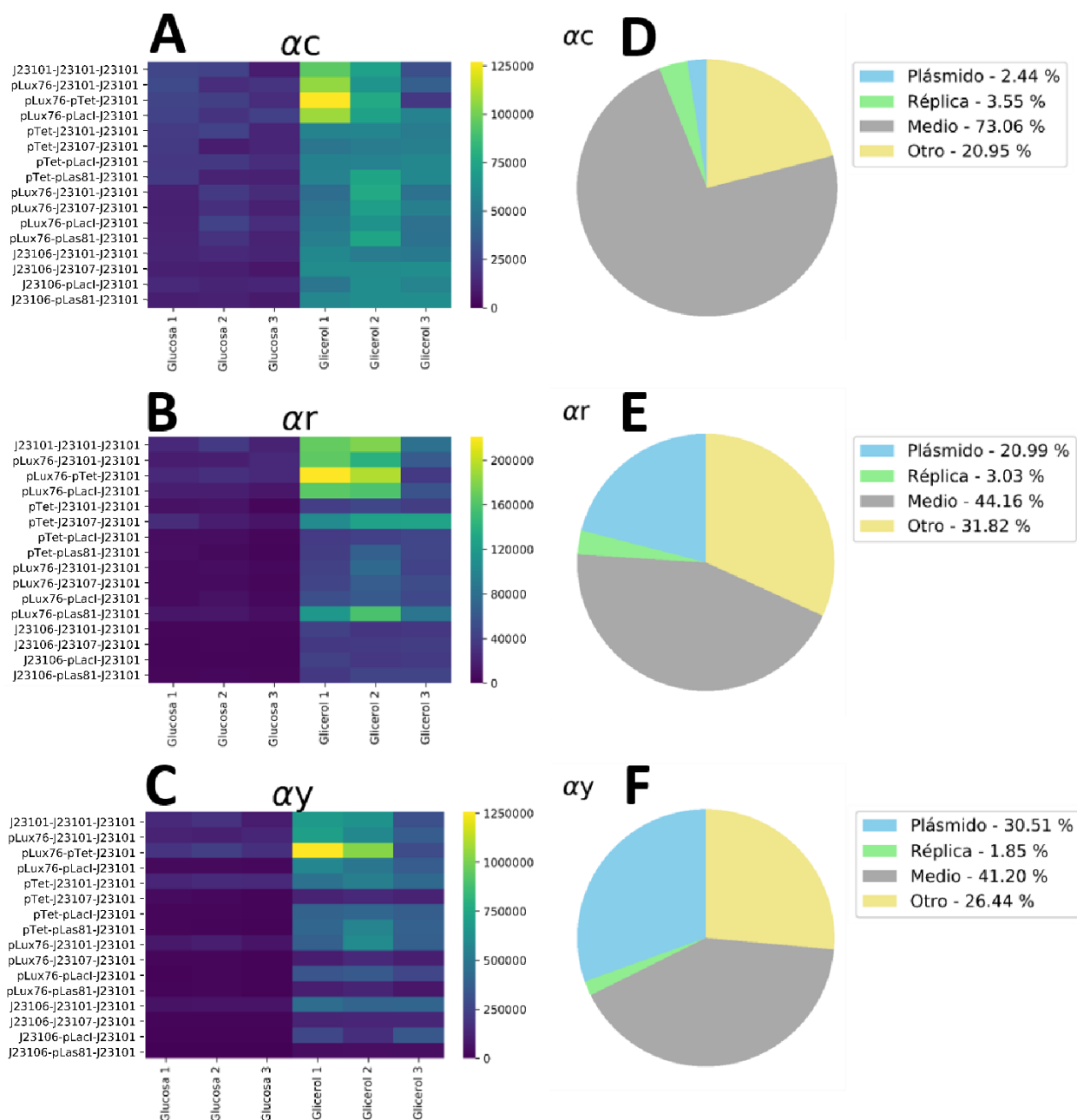


Figura 5.2.1. Valores de Alfas (α_p) entre condiciones. A-C) Heatmaps para los vectores evaluados, los valores corresponden a las pendientes de la relación de intensidad de fluorescencia respecto a la densidad óptica medida. Cada fila representa un vector, mientras que las columnas representan las réplicas por condición, siendo primero glucosa 0,4% y luego glicerol 0,2%. D-F) Pruebas ANOVA para los factores de variación que influyen en α_p , estos son el plásmido utilizado (referente al promotor que dirige su expresión), réplica de ensayo, medio de crecimiento (glucosa o glicerol) y otros (factores que no se pueden definir fácilmente). Las pruebas fueron realizadas mediante el software IBM SPSS Statistics 25.

5.3 Utilizar una referencia disminuye la variación extrínseca en la expresión del reportero de interés

Dado que los valores de α_p presentaban variabilidad, se procedió a determinar las razones o ratios (p_p) entre α_r o α_y con α_c de los distintos promotores, observando que para varios plásmidos evaluados los valores de p_p se hacían similares entre condiciones. De esta forma, la variación entre los valores disminuía al utilizar el promotor de CFP como referencia. Se realizaron pruebas ANOVA para determinar las fuentes de variación principales, y se observó que se redujo la variación por otros factores diferentes al plásmido, sin embargo, seguía existiendo variación por los otros factores (Fig. 5.3.1, A-B-D-E). En el caso de RFP, la variación debido al plásmido utilizado aumentó a 58,42%, mientras que la variación por el medio disminuyó a 21,65% y la variación por otros factores disminuyó a 18,96%. Para YFP de igual manera la variación por el plásmido aumentó a 70,58%, y tanto la variación por el medio y otros factores disminuyó, a 14,25% y 14,56% respectivamente.

De igual modo se evaluó el uso de una referencia distinta al promotor de CFP y se calculó la razón entre α_r y α_y , usando el promotor de YFP como referencia, obteniendo que la variación por el plásmido aumentó a 83,23%, la variación por el medio disminuyó a 2,33% y por otros factores disminuyó a 12,89%(Fig. 5.3.1, C-F). Así, se puede sugerir que, si bien las razones permiten la disminución de las variaciones extrínsecas para los diferentes promotores, al tener un tercer reportero se introduce mayor variación por otros factores que no se pueden reducir de igual forma que al tener solo dos reporteros.

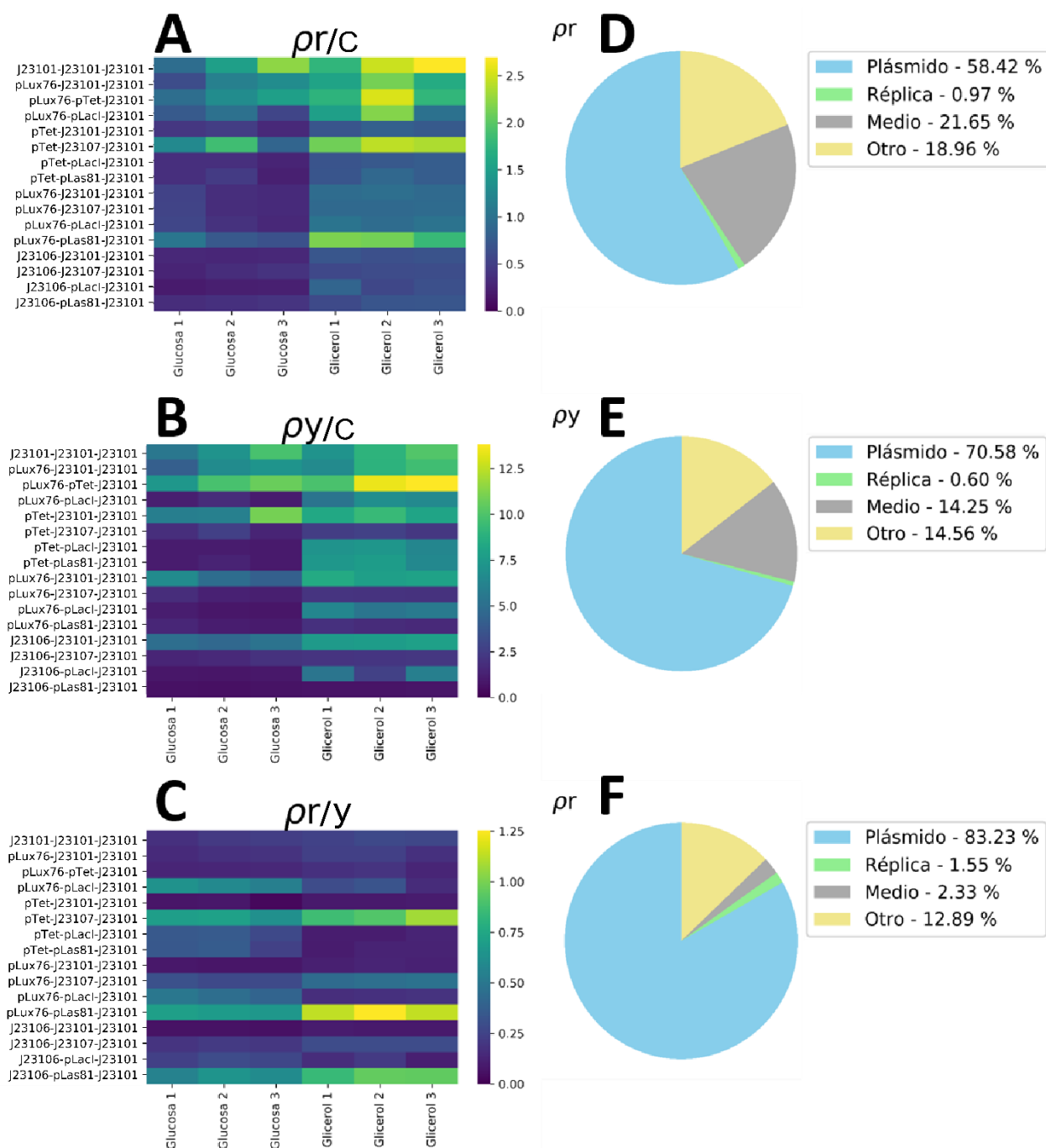


Figura 5.3.1. Las razones (p_p) entre Alfas reducen la variación en los reporteros. A-B) Heatmaps para los valores correspondientes a la razón entre α_p de RFP o YFP y α_p de CFP. Cada fila representa un vector, mientras que las columnas representan las réplicas por condición, siendo primero glucosa 0,4% y luego glicerol 0,2%. C) Heatmap para los valores correspondientes a la razón entre α_p de RFP y α_p de YFP. D-F) Pruebas ANOVA para los factores de variación que influyen en p_p , estos son plásmido utilizado (referente al promotor que dirige su expresión), réplica de ensayo, medio de crecimiento (glucosa o glicerol) y otros. Las pruebas fueron realizadas mediante el software IBM SPSS Statistics 25.

5.4 El uso de dos o más referencias reduce la incertidumbre en las mediciones de fluorescencia

En la figura 5.5.1 se representa la forma en que las variables, las mediciones de fluorescencia de los reporteros, están relacionadas entre sí y qué partes de la información entregada por estas corresponde a las diferentes entropías condicionales. Se representa el caso de tener dos variables o mediciones, al tener tres y en el caso de este trabajo, al tener cuatro mediciones. Para cada variable la cantidad de información total que posee está representada por los círculos, al tener mediciones en un mismo contexto, estas estarán influenciadas por los mismos factores y por lo tanto tendrán influencia sobre las otras mediciones. De esta forma existirá información mutua entre todas las mediciones evaluadas, y valores de entropías condicionales para cada dos o tres mediciones juntas.

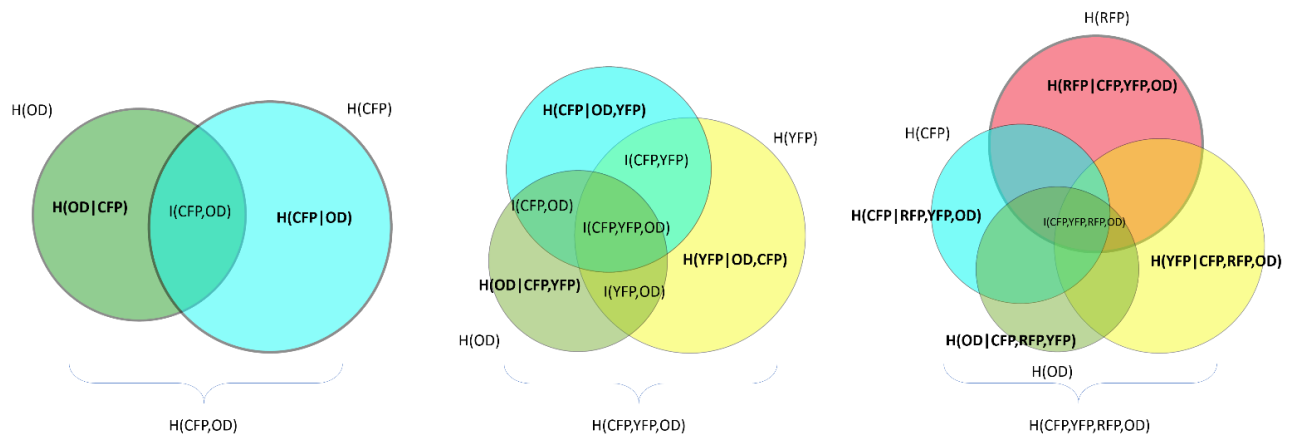


Figura 5.5.1. Diagramas de representación de entropías e información mutua para las mediciones evaluadas. De igual forma que al tener dos y tres mediciones (fig. 3.8.1), al contar con cuatro mediciones, cada una posee su propia entropía independiente, sin embargo, al ser medidas dentro de una colonia, existe información mutua de las cuatro variables, por cada tres y cada dos, y entropías condicionales que entregarán la cantidad de entropía correspondiente solo a cada variable.

Así considerando las mediciones de fluorescencia como señales emitidas, al estar en un mismo contexto celular e influenciadas por el crecimiento celular, compartirán información entre ellas, explicando parte de la información contenida en las otras señales.

Tomando esto en cuenta, se observó la variación de las mediciones en el tiempo (Figs. 5.4.2, 5.4.3, 5.4.4).

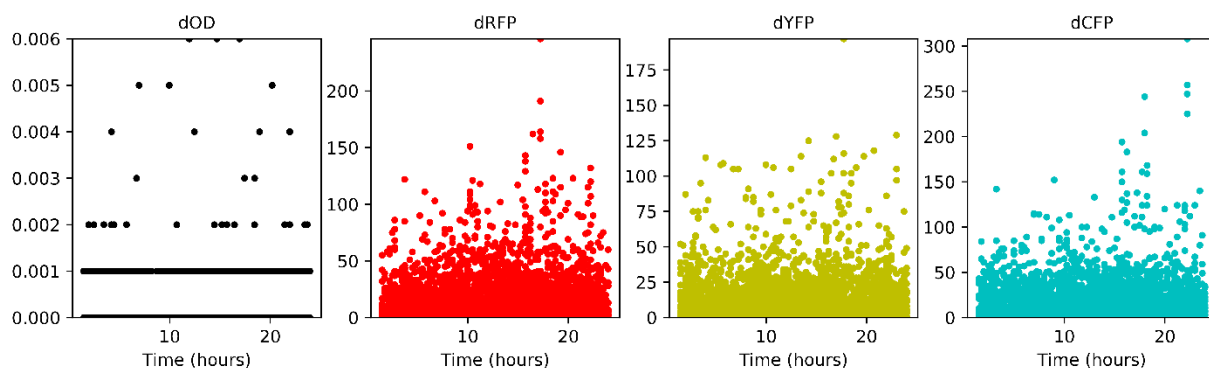


Figura 5.4.2. Variación de los datos de los controles en el tiempo. Se muestran las variaciones de las mediciones de los controles, correspondientes a bacterias no transformadas. Estas variaciones se calculan como el valor en un tiempo menos su antecesor. Las variaciones calculadas no presentan variaciones importantes en el tiempo.

Para las mediciones de los controles no se observa gran variación en el tiempo, dado que corresponden a bacterias no transformadas (Fig. 5.4.2). En contraste, al observar la variación de los reporteros en las diferentes condiciones se puede observar que para cada uno existen diferentes peaks en distintos tiempos (Fig. 5.4.3, 5.4.4). En base a esto, se observa que la relación entre las mediciones es compleja y por esto se decidió utilizar la Entropía de Información como método estadístico de análisis, para evaluar si este método permitiría obtener información específica de los promotores, que se pudiera ser indicativa de su actividad, a modo de característica intrínseca.

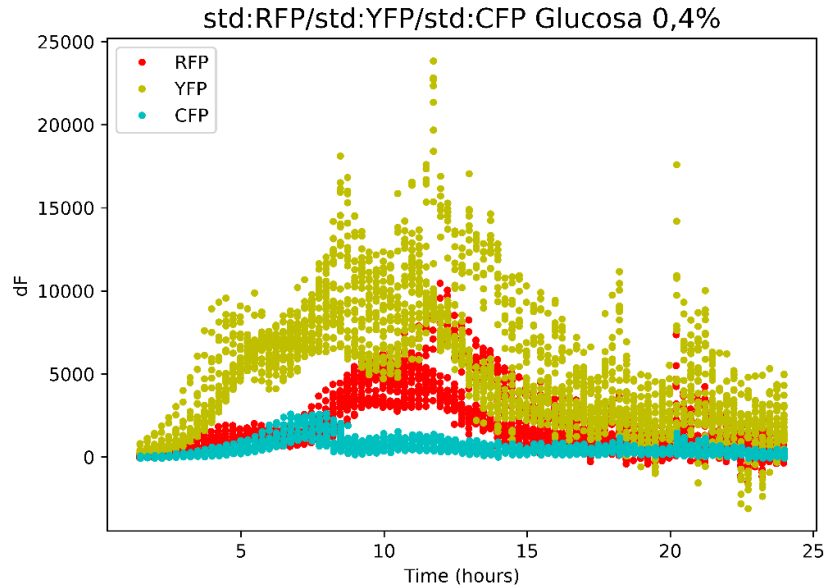


Figura 5.4.3. Variación en el tiempo de las mediciones del vector J23101-J23101-J23101 en Glucosa 0,4%. Ejemplo de las variaciones de las mediciones para el vector en glucosa. Estas variaciones se calculan como el valor en un tiempo menos su antecesor. Las variaciones calculadas no presentan variaciones importantes en el tiempo.

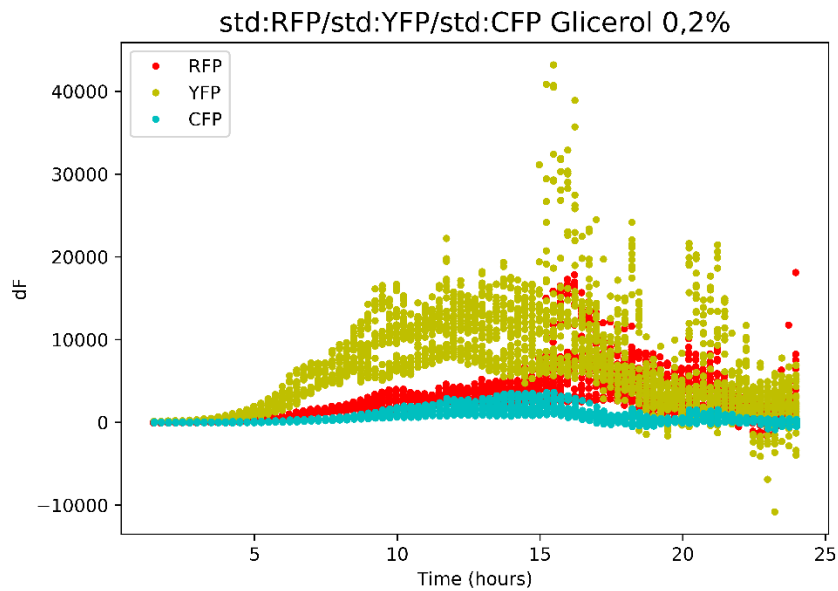


Figura 5.4.4. Variación en el tiempo de las mediciones del vector J23101-J23101-J23101 en Glicerol 0,2%. Ejemplo de las variaciones de las mediciones para el vector en glicerol. Estas variaciones se calculan como el valor en un tiempo menos su antecesor. Las variaciones calculadas no presentan variaciones importantes en el tiempo.

Se calculó entonces la entropía independiente ($H(x)$) de las mediciones de fluorescencia y diferentes entropías condicionales, las cuales correspondían a $H(dp_1 | OD)$, $H(dp_1 | dp_2, OD)$, $H(dp_1 | dp_3, OD)$, $H(dp_1 | dp_2, dp_3, OD)$, donde dp_x representa la variación en el tiempo de los datos de cualquiera de los tres reporteros fluorescentes, y OD representa la variación en el tiempo de los datos de densidad óptica de las colonias. En las figuras 5.4.5 y 5.4.6 la entropía independiente y las entropías condicionales se representan por los números 0, 1, 2, 2 y 3 respectivamente. A modo de ejemplificar y simplificar los resultados, se muestran solo los gráficos obtenidos para YFP, sin embargo, todos los cálculos se realizaron para todos los reporteros.

Observando las entropías condicionales de los datos de todos los promotores que dirigen la expresión de las proteínas fluorescentes hay una disminución importante de la entropía independiente al contar con las otras mediciones, eliminando información redundante entre las mediciones y los factores extrínsecos que influyen las mediciones.

Al graficar los valores de entropías condicionales respecto a la entropía independiente en porcentajes para las mediciones de todos los vectores, se observó que en ambas condiciones al tener entropías con dos o más variables conocidas o “referencias” se reducía la incertidumbre de las mediciones, lo que indicaba una disminución del valor de entropía independiente de cada reportero, dado que las entropías condicionales representan la cantidad de entropía que “queda” cuando se conocen otras variables o en este caso mediciones. De esta forma, al calcular la entropía condicional de los reporteros cuando se conoce la densidad óptica se observa que la reducción de la entropía es muy baja, mientras que al calcular la entropía condicional de los reporteros cuando se conoce una de las otras mediciones de fluorescencia y la densidad óptica, la entropía disminuye más notoriamente. Sin embargo, la máxima reducción posible ocurre al calcular la entropía condicional $H(dp_1 | dp_2, dp_3, OD)$ (Figs. 5.4.5 - 5.4.6).

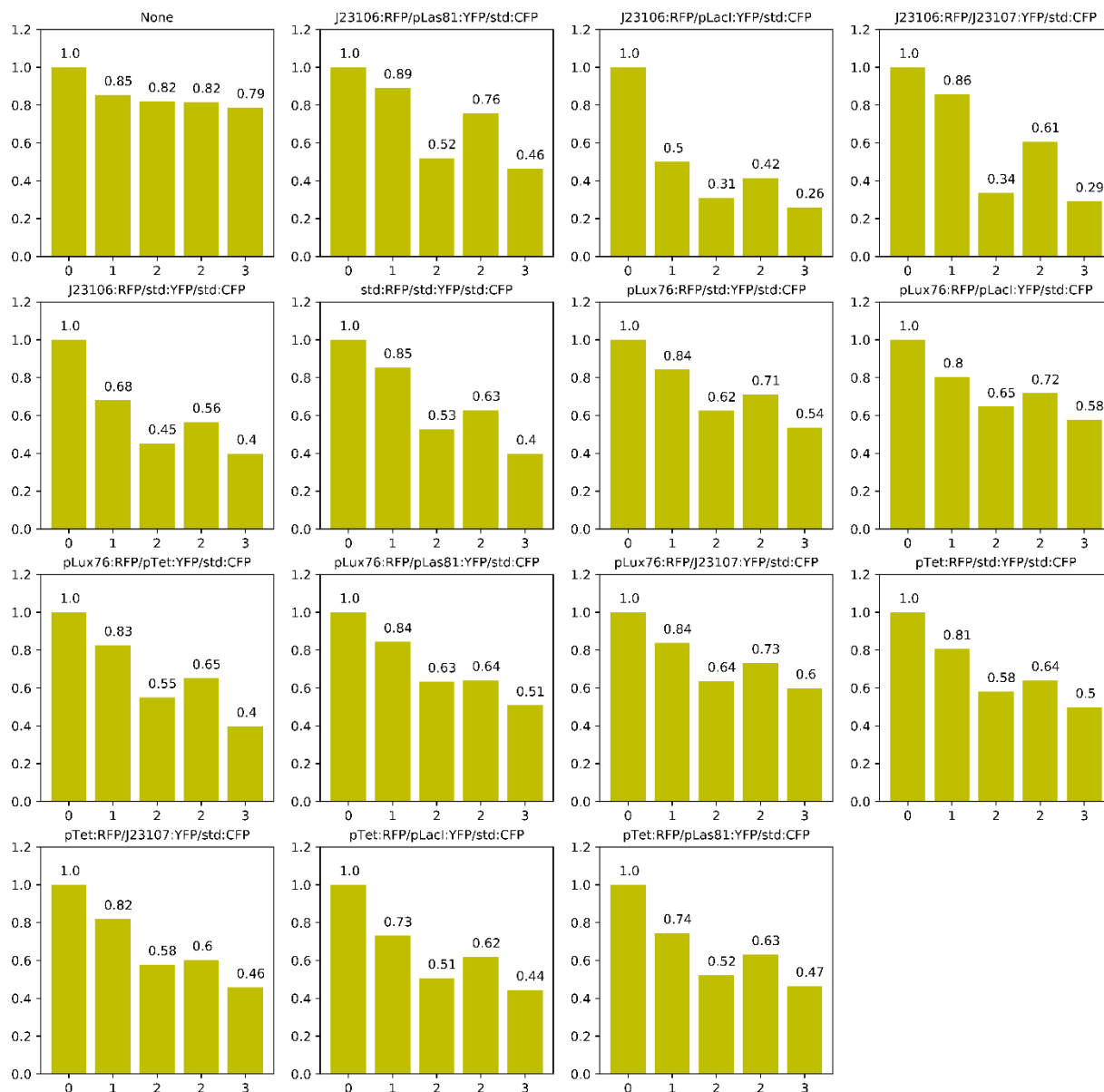


Figura 5.4.5. Entropías independientes y condicionales para los vectores en Glucosa 0,4%. Se muestran los valores de entropía condicional respecto a la entropía independiente de cada vector como razón, separando los cálculos por vector. Se incluye, además, el cálculo de las entropías para los controles, correspondientes a bacterias no transformadas (None). La entropía que reduce en mayor medida la incertidumbre es la correspondiente a $H(dp_1|dp_2, dp_3, OD)$. Los valores de entropía fueron calculados a partir del cambio de los datos en el tiempo, siendo esta variación calculada como la diferencia entre un valor y su antecesor a lo largo de todo el set de datos. Las entropías condicionales se representan con números dependiendo de la cantidad de variables que se consideran como conocidas, siendo 0: $H(dY)$, 1: $H(dY|OD)$; 2: $H(dY|dR, OD)$; 2: $H(dY|dC, OD)$ y 3: $H(dY|dC, dR, OD)$, ubicadas en el gráfico en este orden. Los cálculos y gráficos se realizaron a través de la base de datos del laboratorio.

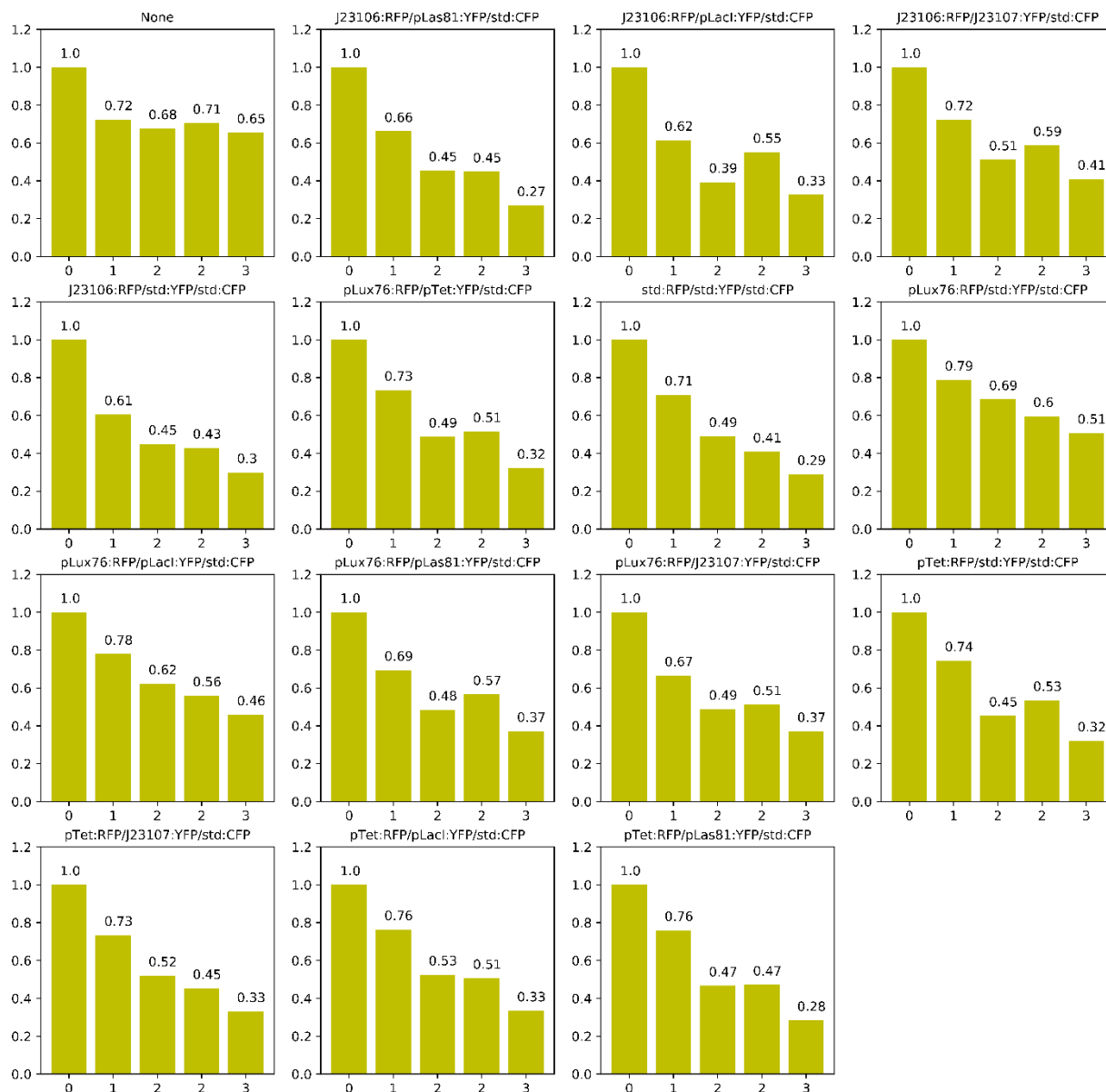


Figura 5.4.6. Entropías independientes y condicionales para los vectores en Glicerol 0,2%. Se muestran los valores de entropía condicional respecto a la entropía independiente de cada vector como razón, separando los cálculos por vector. Se incluye, además, el cálculo de las entropías para los controles, correspondientes a bacterias no transformadas (None). La entropía que reduce en mayor medida la incertidumbre es la correspondiente a $H(dp_1|dp_2, dp_3, OD)$. Los valores de entropía fueron calculados a partir del cambio de los datos en el tiempo, siendo esta variación calculada como la diferencia entre un valor y su antecesor a lo largo de todo el set de datos. Las entropías condicionales se representan con números dependiendo de la cantidad de variables que se consideran como conocidas, siendo 0: $H(dY)$, 1: $H(dY|OD)$; 2: $H(dY|dR, OD)$; 2: $H(dY|dC, OD)$ y 3: $H(dY|dC, dR, OD)$, ubicadas en el gráfico en este orden. Los cálculos y gráficos se realizaron a través de la base de datos del laboratorio.

5.6 La presencia de inductores puede producir cambios en la Entropía de las mediciones

Dado que al tener las diferentes entropías condicionales se observó la disminución del valor de entropía independiente, se decidió evaluar si la presencia de inductores podía producir cambios en la entropía de las mediciones.

Se realizó la comparación de la entropía de los vectores con los promotores pTet y pLacI sin represores ni inductores, y los mismos vectores con anhidrotetraciclina (aTc) o IPTG. Los vectores evaluados fueron tres: pTet-pLacI-J23101, pTet-J23107-J23101 y J23106-pLacI-J23101, siendo el primero evaluado con ambos inductores por separado, el segundo solo con aTc y el tercero solo con IPTG. A modo de ejemplificar y simplificar los resultados, se muestran solo los gráficos obtenidos para YFP, sin embargo, los cálculos se realizaron para todos los reporteros.

Se calcularon las entropías independientes y condicionales de los datos, estando representadas de igual forma que para los gráficos anteriores (Fig. 5.6.1), se puso especial atención a la entropía $H(dp_1 | dp_2, dp_3, OD)$, dado que anteriormente fue la que redujo al máximo posible la incertidumbre de los datos. Al igual que para los datos de entropía observados anteriormente las entropías condicionales con la densidad óptica no disminuían en gran medida el valor de la entropía, y para las entropías condicionales con unas de las otras mediciones y la densidad óptica hay un aumento notorio de la entropía al tener dos y tres referencias al comparar con los valores obtenidos sin presencia de inductores.

En el caso de los controles, no se observa una variación importante entre las diferentes entropías, por lo que se puede considerar que los inductores no afectan en mayor medida a las células.

Al observar los valores de las razones de las entropías, para pTet-pLacI-J23101 se observa aumento de las entropías condicionales al estar expuesto a cualquiera de los dos inductores, de igual manera sucede con J23106-pLacI-J23101 al estar expuesto a IPTG. En el caso de pTet-J23107-J23101 se observa un aumento de las entropías condicionales, a pesar de no tener regulación, puesto que J23107 es un promotor constitutivo, por lo que se puede sugerir que los inductores si producen cambios en la entropía de los reporteros, pero no solo de manera específica.

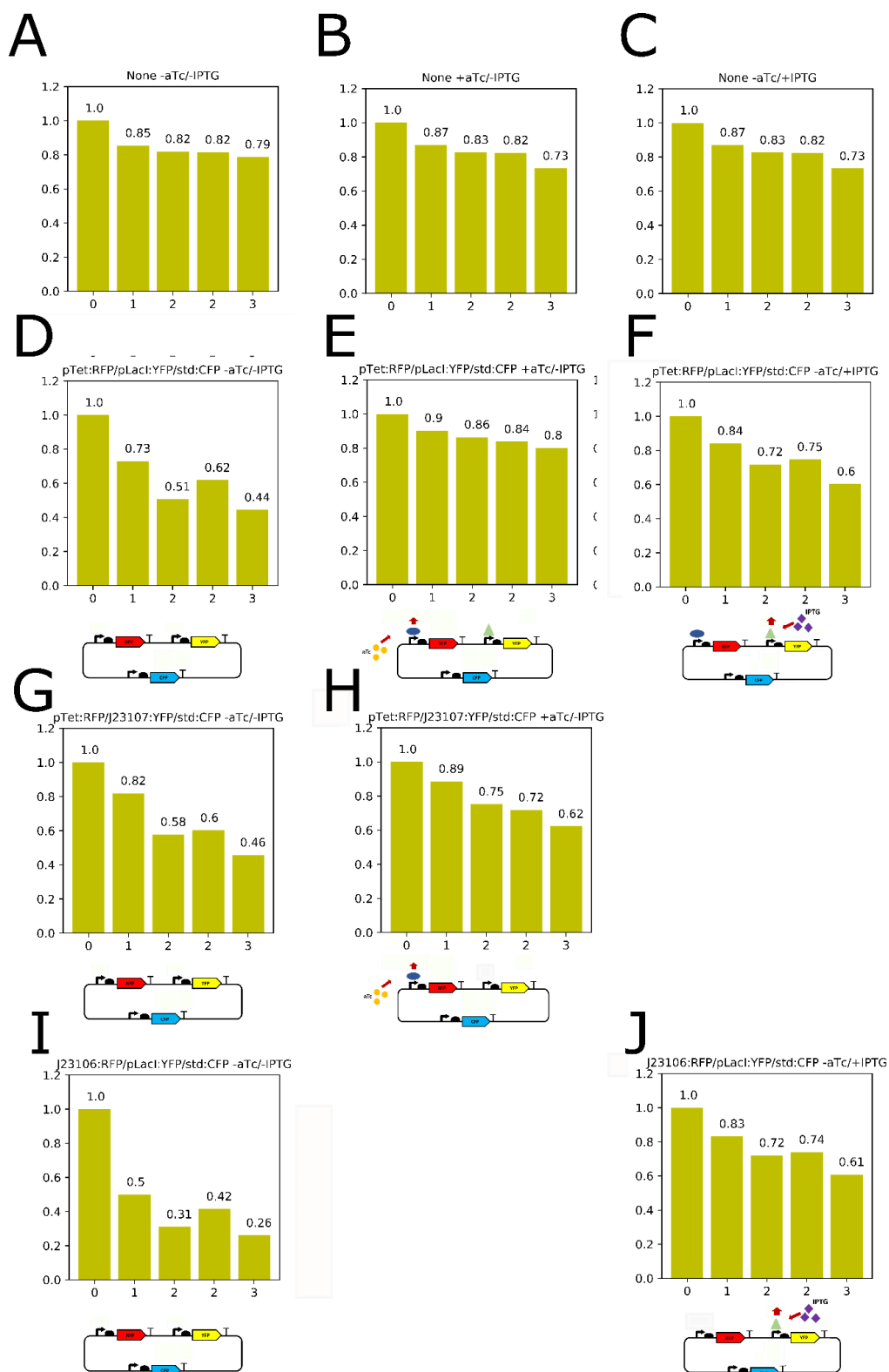


Figura 5.6.1. Entropías condicionales de vectores expuestos o no a inductores. Valores de entropías independientes y condicionales de los vectores expuestos inductores y los mismos vectores sin inductores ni represores. Los vectores evaluados fueron pTet-pLacI-J23101 (D, E, F), pTet-J23107-J23101 (G, H) y J23106-

pLacI-J23101 (I, J), los cuales fueron expuestos a los inductores por separado. Se incluyen también las entropías calculadas para los controles (A, B, C), que corresponden a bacterias sin transformar. Las entropías graficadas corresponden a siendo 0: $H(dY)$, 1: $H(dY|OD)$; 2: $H(dY|dR, OD)$; 3: $H(dY|dC, OD)$ y 4: $H(dY|dC, dR, OD)$, ubicadas en el gráfico en este orden. La entropía que reduce en mayor medida la entropía independiente es la que corresponde a $H(dp_1|dp_2, dp_3, OD)$. Los valores de entropía fueron calculados a partir del cambio de los datos en el tiempo, siendo esta variación calculada como la diferencia entre un valor y su antecesor a lo largo de todo el set de datos. Se muestran, además, esquemas de los vectores y su regulación según sea el caso.

Para tener una idea preliminar de si los cálculos de entropías condicionales están o no influenciadas por la presencia de los inductores se realizaron pruebas ANOVA para los valores de $H(dp_1|dp_2, dp_3, OD)$ de los vectores evaluados con y sin inductores.

Se observó que para YFP la mayoría de la variación se produce por la presencia de inductor (43,42%) y otros factores no específicos (51,25%), mientras que tanto el plásmido utilizado y el medio de cultivo representan porcentajes de variación muy pequeños (2,84% y 2,49%).

YFP

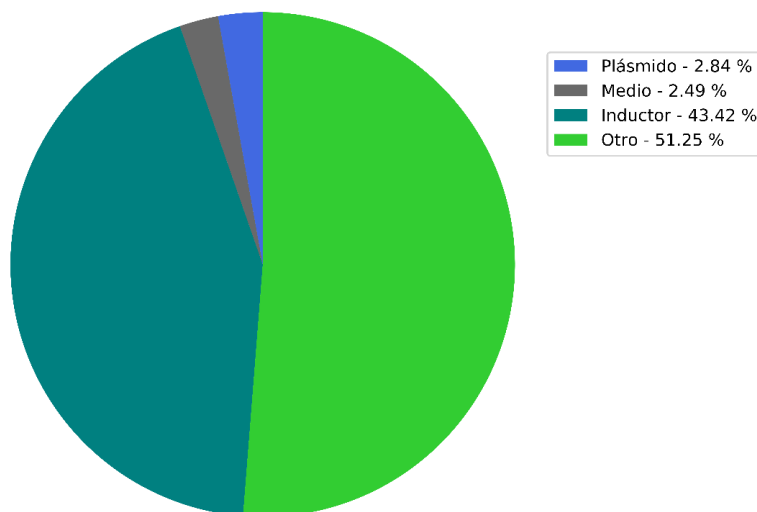


Figura 5.6.2. ANOVA para entropías condicional $H(dp_1|dp_2, dp_3, OD)$. Pruebas ANOVA para los valores de $H(dp_1|dp_2, dp_3, OD)$ de los vectores expuestos o no a inductores para YFP. Los factores considerados son plásmido utilizado (referente al promotor que dirige la expresión del reportero), medio de cultivo, presencia de inductores y otros factores no especificados. Las pruebas fueron realizadas mediante el software IBM SPSS Statistics 25 (IBM).

6. DISCUSIÓN

6.1 Construcción de una librería de vectores mediante un sistema de ensamblaje combinatorial

Para este trabajo se construyó una librería de 37 vectores que consistía en 16 vectores de Unidades Transcripcionales, dos vectores de destino, 18 vectores con tres reporteros y un vector accesorio. Los métodos de ensamblaje utilizados para su construcción fueron Golden Gate y Gibson. Estas técnicas permiten el ensamblaje de partes modulares ordenado y de forma combinatorial, permitiendo realizar varias reacciones separadas al mismo tiempo, reduciendo el tiempo de este proceso mucho menos del tiempo invertido con otro tipo de técnicas de ensamblaje y clonamiento, tanto para la obtención de las partes o fragmentos de DNA a ensamblar como del proceso de construcción en sí, además de reducir los costos respecto a los reactivos utilizados. Otra de las ventajas de estas técnicas es que permiten estandarizar las secuencias utilizadas, puesto que las secuencias que permiten el ensamblaje ordenado son universales, y se pueden construir vectores con partes nuevas que tengan estas secuencias en el laboratorio. Además, está la posibilidad de su uso por terceros si trabajan con estas técnicas, favoreciendo también el intercambio de partes entre laboratorios (Gibson *et al.*, 2009; Iverson *et al.*, 2016; Weber *et al.*, 2011)

6.2 El análisis ratiométrico no es suficiente para eliminar la variación extrínseca al contar con tres reporteros

El análisis ratiométrico permite disminuir la variación extrínseca que afecta la expresión de reporteros fluorescentes de forma eficiente cuando se cuenta con reporteros dentro de un mismo plásmido, donde uno de ellos es el reportero de interés y el otro un reportero de referencia, dado que ambos están influenciados por los mismos factores por estar dentro del mismo contexto génico y celular (Rudge y Federici, 2016). Para realizar este análisis con los datos de los ensayos de crecimiento, en primer lugar, se realizaron ajustes para las densidades ópticas de los promedios de réplicas por ensayo utilizando el modelo de crecimiento de Gompertz (Zwietering *et al.*, 1990), del cual se obtuvieron curvas de ajuste que coinciden con las curvas de densidad óptica respecto al tiempo de los datos en el

tiempo, siendo los parámetros entregados por los ajustes suficientes para determinar la fase exponencial. Estos parámetros corresponden al crecimiento máximo alcanzado (A), el tiempo de la fase lag (λ) y es el máximo de la tasa de crecimiento (μ_m). Sin embargo, a pesar de que los parámetros permitían determinar los tiempos entre los que se producía la fase exponencial, fue necesario seleccionar los datos dentro de la fase de forma manual para los cálculos y gráficos posteriores para cada promedio de réplica de ensayo, pues en cada caso la fase exponencial ubicación en el tiempo distinta incluso dentro de la misma condición y tenían duración distinta entre condiciones, dificultando utilizar una función general para todas densidades ópticas de las colonias, lo que además puede introducir errores para los cálculos posteriores. Por ejemplo, para las colonias que crecieron en glucosa la fase exponencial empezaba antes y duraba menos tiempo pues el crecimiento de las colonias es más rápido. Para el caso de las colonias en glicerol la fase exponencial empezaba más tarde y las colonias tenían un crecimiento exponencial paulatino. Esto es debido a que el uso de glicerol como fuente de carbono produce estrés durante el crecimiento celular similar al producido durante fase estacionaria al terminarse la glucosa disponible en medios de cultivo (Martinez-Gomez *et al.*,2012), provocando este crecimiento más lento. De esta forma este ajuste fue útil para la determinación de la fase exponencial para los valores de densidad óptica, sin embargo, puede ser necesario buscar otro tipo de modelos de crecimiento que permitan encontrar de forma más precisa la fase exponencial para el crecimiento de bacterias. También se puede considerar el desarrollo de códigos de análisis que permitan un cálculo más preciso y de varios datos al mismo tiempo, tanto para evitar errores como para agilizar el análisis.

Sin embargo, esto no dificultó los cálculos posteriores. Se graficaron los datos de fluorescencia respecto a densidad óptica, seleccionando los datos ubicados dentro de la fase exponencial determinada previamente y se realizó un ajuste lineal. En estos gráficos se observó que las mediciones de fluorescencia mostraban dependencia de la densidad óptica (Rudge y Federici, 2016), dado que dentro de la fase exponencial las curvas mostraban una relación proporcional, lo que se

reflejó al realizar las regresiones lineales, mostrando una correlación buena entre los datos graficados ($R^2 \approx 0,9$).

Las pendientes obtenidas de estos ajustes lineales corresponden a los valores de α_p , los cuales son similares por condición para cada promotor, pero entre condiciones son muy diferentes, esto coincide con lo descrito en el trabajo previo (Rudge y Federici, 2016), donde α_p se consideró inicialmente característica intrínseca del promotor para una condición puntual, pero que al evaluar estas características en distintas condiciones los valores no se mantenían constantes. Las pruebas ANOVA muestran que la variación no es solo por el plásmido utilizado (referente al promotor que dirige al reportero), sino que se incluye el medio y otros factores, siendo el de menor incidencia la réplica de ensayo para todos los α_p . Para el caso de CFP la mayoría de la variación es debido al medio utilizado (73,06%) y otros factores no especificados (20,95%), lo cual es adecuado al ser siempre un promotor constitutivo el que dirige su expresión, puesto que este tipo de promotores es un indicador del metabolismo celular y sus fluctuaciones, y por esta razón suelen preferirse como referencias en este tipo de métodos (Gerosa *et al.*, 2013). Para RFP el plásmido utilizado representa el 20,99% y para YFP el 30,51%, el medio representa el 44,16% y el 41,20% de la variación respectivamente y otros factores no especificados corresponden al 31,82% y 26,44% respectivamente. Esto indica que estas características están influenciadas por factores extrínsecos de forma similar al compararlos, y que su variación no se debe sólo al promotor. Así, α_p no puede ser característica intrínseca de los promotores, dado que una característica de este tipo debería solo estar influenciada por el promotor que dirige al reportero y no variar frente a factores diferentes a este (Rudge y Federici, 2016; Keren *et al.*, 2013).

Posteriormente, se procedió a determinar las razones o ratios (ρ_p) entre α_r o α_y con α_c de los reporteros dirigidos por los distintos promotores, observando que para varios plásmidos evaluados los valores de ρ_p se hacían similares entre condiciones, consistente con lo descrito en el trabajo previo (Rudge y Federici, 2016). De esta forma, la variación entre los valores disminuía al utilizar CFP y su promotor como referencia.

Se realizaron pruebas ANOVA para determinar las fuentes de variación principales, y se observó que se redujo la variación debido a los otros factores diferentes al plásmido. En el caso de RFP, la variación debido al plásmido utilizado aumentó a 58,42%, disminuyendo para los otros factores a aproximadamente la mitad del valor observado para α_r . Para YFP de igual manera la variación por el plásmido aumentó a 70,58%, y tanto la variación por el medio y otros factores disminuyó.

De igual modo se evaluó el uso de una referencia distinta al promotor de CFP y se calculó la razón o ratio entre α_r y α_y , usando el promotor de YFP como referencia, obteniendo que la variación por el plásmido aumentó a 83,23%, la variación por el medio disminuyó a 2,33% y por otros factores disminuyó a 12,89%(Fig. 4.3.1, C-F).

Así, si bien las razones permiten la disminución de la variación por factores diferentes al plásmido utilizado, al tener un tercer reportero el resultado es distinto a lo esperable, puesto que con dos reporteros se lograba reducir la variación a menos de 4%, siendo la variación por el plásmido 96% (Rudge y Federici, 2016). Para el caso de este trabajo, al calcular las razones, sigue existiendo un porcentaje no menor de variación que no es atribuible al plásmido. Esto podría ser debido a la cercanía de RFP e YFP dentro de los vectores, puesto que se ha descrito que la disposición espacial de las construcciones en los circuitos génicos puede influenciar la expresión de estas, dado que son altamente sensibles al contexto donde se introducen (Yeung et al., 2016).

Dado que se observó que las razones (ρ_p) para los diferentes promotores reducían parcialmente la variación por factores extrínsecos, se sugiere que el método ratiométrico no es suficiente para eliminar las variaciones al contar con más de dos reporteros en un mismo plásmido.

6.3 La relación y expresión de los reporteros en el tiempo es compleja

Debido a lo anterior se buscaron otros métodos para el análisis de los datos de fluorescencia. Para esto, se utilizó el concepto de entropía de información, descrito en la Teoría de información (Shannon, 1948), la cual estudia la forma en que la

información es almacenada, transmitida, recibida y utilizada entre sistemas o en este caso, individuos. En un contexto biológico, las células son capaces de percibir cambios en su entorno y en respuesta producen diferentes procesos (Gatenby y Frieden, 2007), esto se traduce en que son capaces de recibir la información de su entorno y al generar respuestas producen más información, que como en el caso de los reporteros fluorescentes, es capaz de ser medida y analizada.

Al contar con reporteros dentro de un mismo vector, estos estarán influenciados por el crecimiento celular y la disponibilidad de recursos para su expresión (Klumpp, Zhang y Hwa, 2009), teniendo una dependencia directa de estos. Además, existe una suerte de competencia entre los reporteros por estos recursos por estar en el mismo contexto génico (Yeung et al., 2016), lo que se traduce en una influencia de los reporteros entre sí. Esto se representa en el diagrama de la Figura 5.5.1 como información compartida entre los reporteros y con la densidad óptica, que además contiene los factores extrínsecos a los que está sujeta la expresión de estos.

De esta forma, de la información que se puede obtener de cada reportero, una cantidad es compartida con los otros dos y la densidad óptica, y es por esto que se calculó la entropía independiente ($H(x)$) de las mediciones de fluorescencia y sus diferentes entropías condicionales, las cuales correspondían a $H(dp_1 | OD)$, $H(dp_1 | dp_2, OD)$, $H(dp_1 | dp_3, OD)$, $H(dp_1 | dp_2, dp_3, OD)$, donde los datos se utilizaron como la variación en el tiempo de las mediciones.

6.4 El uso de la Entropía de Información es útil para reducir la variación extrínseca de los reporteros

Al graficar las razones entre las entropías condicionales y la entropía independiente para las mediciones de todos los vectores, se observó que en ambas condiciones al tener entropías con dos o más variables conocidas o “referencias” se reducía la incertidumbre de las mediciones, lo que indicaba una disminución del valor de entropía independiente de cada reportero, dado que las entropías condicionales representan la cantidad de entropía que “queda” cuando se conocen otras variables o en este caso mediciones (Shannon, 1948; Adami, 2004).

De esta forma, al calcular la entropía condicional cuando se conoce la densidad óptica se observa que la reducción de la entropía es muy baja, mientras que al calcular la entropía condicional de los reporteros cuando se conoce una de las otras mediciones de fluorescencia y la densidad óptica, la entropía disminuye a aproximadamente a la mitad. Lo que sugiere que si bien, se ha descrito que la expresión de reporteros es dependiente del crecimiento de la población (Klumpp, Zhang y Hwa, 2009), y por lo tanto tendrán información mutua, se comparte más información con los otros reporteros, puesto que disminuye mucho más el valor de entropía independiente.

Sin embargo, la máxima reducción posible ocurre al calcular la entropía condicional $H(dp_1 | dp_2, dp_3, OD)$, donde la entropía independiente se reduce aún más que al contar con solo dos referencias, en ambas condiciones.

Esto indica que mientras menor es la proporción de la entropía condicional respecto a la entropía independiente, mayor es la cantidad de información explicada por las otras mediciones en la medición de interés.

Al observar esto, se calcularon las entropías condicionales de las proteínas fluorescentes para todos los promotores por vector y por condición de forma independiente. Se observó que de igual forma que al tener la entropía de todos los datos, esta se reducía al contar con dos o tres referencias, y que la densidad óptica es la referencia que menos reduce la entropía. Dentro de las entropías condicionales, la que reducía al máximo posible la entropía independiente era también $H(dp_1 | dp_2, dp_3, OD)$, siendo los valores entre condiciones relativamente similares y mucho más bajos que para las otras entropías condicionales, siendo similares entre los diferentes reporteros.

Así, a través de este método se obtiene la reducción máxima de factores extrínsecos al tener tres referencias, que, si bien no es una mayor cantidad de información que al tener solo dos referencias, debería ser información más específica respecto a la actividad del promotor evaluado, la cual podría considerarse como característica intrínseca.

6.5 El uso de la Entropía de Información es útil para detectar la presencia de inductores

También se evaluó si la presencia de inductores podía producir cambios en la entropía de las mediciones. Se realizó la comparación de la entropía de los vectores con los promotores pTet y pLacI sin represores ni inductores, y los mismos vectores con anhidrotetraciclina (aTc) o IPTG. Los vectores evaluados fueron tres: pTet-pLacI-J23101, pTet-J23107-J23101 y J23106-pLacI-J23101, siendo el primero evaluado con ambos inductores por separado, el segundo solo con aTc y el tercero solo con IPTG.

Se realizaron los mismos cálculos de las diferentes entropías de los datos y se puso especial atención a la entropía $H(dp_1 | dp_2, dp_3, OD)$, dado que anteriormente fue la que redujo al máximo posible la entropía independiente. Al igual que para los datos de entropía observados anteriormente las entropías condicionales con la densidad óptica no disminuían en gran medida el valor de la entropía. En el caso de los controles, no se observa una variación importante entre las diferentes entropías, por lo que se puede considerar que los inductores no afectan en mayor medida a las células, y dado que los controles no estaban transformados, las entropías solo podían estar influenciadas por la densidad óptica.

Al observar los valores de las razones de las entropías, para pTet-pLacI-J23101 se observa aumento de las entropías condicionales al estar expuesto a cualquiera de los dos inductores, de igual manera sucede con J23106-pLacI-J23101 al estar expuesto a IPTG. En el caso de pTet-J23107-J23101 se observa un aumento de las entropías condicionales, a pesar de no tener regulación, puesto que J23107 es un promotor constitutivo.

La regulación por LacI produce mayor expresión del reportero, dado que deja de ser reprimido el promotor pLacI al estar presente IPTG (Dvorak *et al.*, 2015), lo que se traduce en un aumento de la entropía condicional $H(dp_1 | dp_2, dp_3, OD)$. En el caso de este mismo vector sin inductores ni represores, el bajo nivel de entropía se debe a que pLacI también es regulado por CAP, el cual también reprime su expresión al estar en un medio con glucosa de igual forma que lo haría LacI (Dvorak *et al.*, 2015).

También se debe tener en cuenta que pTet al ser un promotor regulado, estará influenciado por su represor TetR y aTc (*Köstner et al.*, 2006), y que los reporteros comparten información al estar dentro del mismo contexto celular, por lo que las variaciones de RFP y por ende en sus valores de entropía, influyen en cierta medida los valores de las entropías condicionales de YFP, y esto se vería reflejado en el aumento de las entropías de esta medición en presencia de aTc.

Para tener una idea de si los inductores tienen un efecto sobre las entropías condicionales de las mediciones, se realizó una prueba ANOVA para los valores de $H(dp_1|dp_2, dp_3, OD)$ de todos los datos de estos vectores evaluados con y sin inductores. Para YFP gran parte de la variación sería por la presencia de inductor (43,42%), lo que coincide con los aumentos de entropía observados en presencia de inductores. Los factores que menos influyen en su variación son el plásmido utilizado (2,84%) y el medio, siendo otros lo que más influye (51,25%).

En base a esto, la presencia de inductores puede producir cambios en los valores de entropía condicional, sin embargo, es necesario contar con más ensayos que tengan presencia de inductores para tener aproximaciones más precisas de lo que ocurre.

Al retomar la hipótesis de este trabajo, la cual es que utilizar tres genes reporteros, fusionados a promotores, permite obtener más información sobre las respuestas de los sistemas frente a señales de interés, se observa que a través de la Entropía de Información se reduce la mayoría de la información redundante posible, y por lo tanto se obtiene una mayor cantidad información útil, debido a que sería específica del promotor que dirige al reportero y por lo tanto indicativa de su actividad en presencia de las distintas fuentes de carbono e inductores, lo que será útil al momento de determinar las variaciones en la expresión de los reporteros al ser utilizados en biosensores.

7. CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES

7.1 Conclusiones

En este trabajo se demostró que el uso del método ratiométrico no era eficiente para reducir la variación al tener vectores con tres reporteros fluorescentes y que el uso de la Entropía de información permite caracterizar las relaciones entre reporteros y sus promotores, independiente de las condiciones de crecimiento, y determinar la presencia o no de inductores.

También se determinó que el uso de dos o más referencias entrega más información útil respecto a la información contenida en los reporteros, al realizar el análisis con la Entropía de Información.

De esta forma, lo expuesto en este trabajo permitirá el diseño de biosensores mediante el análisis de reporteros basado en la Teoría de Información, siendo un mejor análisis que el método ratiométrico para este propósito. Y que, al contar con una mayor cantidad de reporteros es posible obtener información más precisa sobre la actividad del promotor de cada uno, para detectar cambios debido a señales de interés.

7.2 Proyecciones

El trabajo futuro propuesto para este trabajo es en primer lugar realizar ensayos con una cepa diferente de *Escherichia coli*, debido a que la cepa utilizada en este trabajo es útil para la selección y propagación de vectores, pero no es ideal para expresión. De esta forma, se pueden realizar comparaciones al utilizar una cepa más similar a una silvestre como lo es la cepa MG1655Z1.

También se realizará el análisis de una célula a través de microscopía, a modo de realizar comparaciones entre individuos y poblaciones, utilizando la Entropía de Información.

Para descartar que la posición espacial de los reporteros dentro de los vectores inflencie la cantidad de información que se puede obtener de los reporteros, se realizaran ensayos con vectores que contengan los reporteros en posiciones diferentes.

Finalmente, también se debe realizar una mayor cantidad de ensayos con inductores, tanto en diferentes concentraciones y combinaciones, como otros tipos de inductores.

8. REFERENCIAS

- Adami C.** (2004) Information Theory in molecular biology. *Physics of Life reviews*. Vol. 1, p. 3-22.
- Alon U.** (2007) Transcription Networks: Basic Concepts. En: *An introduction to Systems Biology: Design Principles of Biological Circuits*. 1st Ed., Chapman & Hall /CRC Press, Boca Raton, United States, p. 5-27.
- Baldwin G.** (2012) Parts, Devices and Systems. En: *Synthetic Biology: A Primer*. 1st Ed., Imperial College Press, London, England, p. 78-91.
- Bashor C.J., Horwitz A.A., Peisajovich S.G., Lim W.A.** (2010) Rewiring Cells: Synthetic Biology as a Tool to Interrogate the Organizational Principles of Living Systems. *Annual Reviews of Biophysics*, Vol. 39, p.515-537.
- Benenson Y.** (2012) Biomolecular computing systems: principles, progress and potential. *Nature Reviews*. Vol 13, p. 455-468.
- Bousse L.** (1996) Whole cell biosensors. *Sensors and Actuators*. Vol. 34, p. 270-275.
- Cooper J.C., Hall E.A.H.** (1988) The nature of biosensor technology. *J. Biomed. Eng.*, Vol 10, p.210-219.
- Date A., Pasini P., Daunert S.** (2010) Fluorescent and bioluminescent cell-based sensors: strategies for their preservation. *Advances in biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 117, p.57-75.
- Durfee T., Nelson R., Baldwin S., Plunkett G. 3rd, Burland V., Mau B., Petrosino J.F., Qin X., Muzny D.M., Ayele M., Gibbs R.A., Csörgo B., Pósfai G., Weinstock G.M., Blattner F.R.** (2008) The Complete Genome Sequence of Escherichia coli DH10B: Insights into the Biology of a Laboratory Workhorse. *Journal of Bacteriology*. Vol. 190, No. 7, p. 2597–2606.
- Dvorak P., Chrast L., Nikel P.I., Fedr R., Soucek K., Sedlackova M., Chaloupkova R., de Lorenzo V., Prokop Z., Damborsky J.** (2015) Exacerbation of substrate toxicity by IPTG in *Escherichia coli* BL21 (DE3) carrying a synthetic metabolic pathway. *Microbial Cell Factories*. Vol. 14, p. 201.
- Elowitz M.B., Levine A.J., Siggia E.D., Swain P.S.** (2002) Stochastic Gene Expression in a Single Cell. *Science*, vol. 297, p. 1883-1886.
- Engler C., Marillonnet S.** (2014) Golden Gate Cloning. *Methods Mol Biol*, 1116:119-31.
- Gatenby R.A., Frieden B.R.** (2007) Information Theory in Living Systems, Methods, Applications, and Challenges. *Bulletin of Mathematical Biology*. Vol. 69, p. 635-657.
- Gerosa L., Kochanowski K., Heinemann M., Sauer U.** (2013) Dissecting specific and global transcriptional regulation of bacterial gene expression. *Molecular Systems Biology*. Vol. 9, No 658.

Gibson D.G., Young L., Chuang R.Y., Venter J.C., Hutchison III C.A., Smith H. (2009) Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, vol. 6, n°5, p.343-347.

Glieberman A.L., Monie D.D., Endy D. (2009) Measuring the activity of BioBrick promoters using an in vivo reference standard. *Journal of Biological Engineering*, vol. 3, No. 4.

<http://blog.addgene.org/plasmids-101-common-lab-e-coli-strains> (24/09/2016, 16:45)

<https://www.neb.com/products/restriction-endonucleases/restriction-endonucleases/types-of-restriction-endonucleases> (27/10/2016, 15:27)

http://www.sas.com/en_id/insights/analytics/machine-learning.html (30/09/2016, 11:50)

<http://www.uniprot.org/uniprot/P0AFF4> (24/09/2016, 17:05)

Hsiu-Chuan Liao V., Ou K.L. (2005) Development and testing of a Green Fluorescent Protein-based Bacterial Biosensor for measuring bioavailable Arsenic contaminated groundwater samples. *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol.24, n°7, p. 1624-1631.

Ivasiuk L.A. (1975) Influence of the recA- mutation on spontaneous filamentation and the titer of the lambda phage in ylonB- mutants of E. coli K12 (lambda). *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, 4:95-7.

Iverson S.V., Haddock T.L., Beal J., Densmore D.M. (2016) CIDAR MoClo: Improved MoClo Assembly Standard and New *E. coli* Part Library Enable Rapid Combinatorial Design for Synthetic and Traditional Biology. *ACS Synth Biol*,15;5(1):99-103.

Kelly J. R., Rubin A. J., Davis J. H., Ajo-Franklin C. M., Cumbers J., Czar M. J., de Mora K., Gliberman A. L., Monie D. D., Endy D. (2009) Measuring the activity of BioBrick promoters using an in vivo reference standard. *Journal of Biological Engineering*, 3:4.

Lei Y., Chen W., Mulchandani A. (2006) Microbial Biosensors. *Analytica Chimica Acta*, Vol. 586, p. 200-210.

Keren L., Zackay O., Lotan-Pompan M., Barenholz U., Dekel E., Sasson U., Aidelberg G., Bren A., Zeevi D., Weinberger A., Alon U., Milo R., Segal E. (2013) Promoters maintain their relative activity levels under different growth conditions. *Molecular Systems Biology*. Vol. 9, No 701.

Köstner M., Schmidt B., Bertram R., Hillen W. (2006) Generating Tetracycline-Inducible Auxotrophy in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by Using an Insertion Element and Hyperactive Transposase. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 72, No 7, p. 4717-4725.

Klumpp S., Zhang Z., Hwa T. (2009) Growth -rate dependent global effects on gene expression in bacteria. *Cell*. Vol. 139, No 7, p. 1366.

Martínez-Gómez K., Flores N., Castañeda H.M., Martínez-Batallar G., Hernández-Chávez G., Ramírez O.T., Gosset G., Encarnación S., Bolívar F. (2012) New insights to *Escherichia coli* metabolism: carbón scavenging acetate metabolism and carbón recycling responses during growth on glycerol. *Microbial Cell Factories*. Vol. 11, p. 46.

Noireaux V., Bar-Ziv R., Libchaber A. (2003) Principles of cell-free genetic circuit assembly. *PNAS*, vol. 100, No. 22, p. 12672-12677.

Tamsir A., Tabor J. J., Voigt C. A. (2011) Robust multicellular computing using genetically encoded NOR gates and chemical 'wires'. *Nature*. Vol. 469, No. 7329, p. 212–215.

Thompson R.B. (2008) Fluorescence lifetime biosensing: entering the mainstream. En: *Optical Biosensors: Today and Tomorrow*. Ligler. F.S., Rowe C.T., 2nd Ed., Elsevier, Oxford, UK, p. 287-300.

Lim J.W., Ha D., Lee J., Lee S.K., Kim T. (2015) Review of micro/nanotechnologies for microbial biosensors. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Vol. 3, artículo 61.

Lowe C.R. (1989) Biosensors. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. Vol. 134, No. 1224, p. 487-496.

MacDonald I.C., Deans T.L. (2016) Tools and applications in Synthetic Biology. *Advanced Drugs Delivery Systems*, Vol. 105, p. 20-34.

Meighen E.A. (1993) Bacterial bioluminescence: organization, regulation and application of the *lux* genes. *The FASEB Journal*, vol.7, No.7, p. 1016-1022.

Park M., Tsai S.L. and Chen W. (2013) Microbial Biosensors: Engineered Microorganisms as the Sensing Machinery. *Sensors*, vol. 13, p. 5777-5795.

Reshetilov A.N., Iliasov P.V., Reshetilova T.A. (2010) The Microbial Cell Based Biosensors. En: *Intelligent and Biosensors*, Vernon S. Somerset (Editor), 1st ed. Intech, Vukovar, Croatia.

Rudge T.J., Brown J.R., Federici F., Dalchau N., Phillips A., Ajioka J.W., Haseloff J. (2015) Characterization of Intrinsic Properties of Promoters. *ACS Synthetic Biology*, vol. 5, p. 89–98.

Siuti P., Yazbek J., Lu T. K. (2013) Synthetic circuits integrating logic and memory in living cells. *Nature Biotechnology*. Vol 31, p. 448-453.

Timms A.R., Steingrimsdottir H., Lehmann A.R., Bridges B.A. (1992) Mutant sequences in the *rpsL* gene of *Escherichia coli* B/r: mechanistic implications for spontaneous and ultraviolet light mutagenesis. *Mol Gen Genet*. 232(1):89-96.

Torella J.P., Boehm C.R., Lienert F., Chen J.H., Way J.C., Silver P.A. (2014) Rapid construction of insulated genetic circuits via synthetic sequence-guided isothermal assembly. *Nucleic Acids Research*, Vol. 42, No. 1 681–689.

Torella J.P., Boehm C.R., Lienert F., Chen J.H., Way J.C., Silver P.A. (2014) Unique nucleotide sequence–guided assembly of repetitive DNA parts for synthetic biology applications. *Nature Protocols*, Vol. 9, n°9, p.2075-2089.

Weber E., Engler C., Gruetzner R., Werner S., Marillonnet S. (2011) A Modular Cloning System for Standardized Assembly of Multigene Constructs. *Plos One*, vol. 6, Issue 2, e16765.

Yeung E., Dy A.J., Martin K.B., Ng A.H., Del Vecchio D., Beck J.L., Collins J.J., Murray R.M. (2016) The Effect of Compositional Context on Synthetic Gene Networks. *BioRxiv*. Doi: doi.org/10.1101/083329.

Zwietering M.H., Jongenburger I., Rombouts F.M., van T Riet K. (1990) Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 1875-1881.

ANEXO

Genotipo de *Escherichia coli* TOP10

El genotipo de las bacterias que serán utilizadas en el presente trabajo es: **F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG λ⁻**, el cual se detalla a continuación:

F⁻: no contiene plásmido F. No realiza conjugación con otras bacterias, pues las proteínas necesarias para esto están codificadas en el plásmido F.

mcrA/mcrBC: inactivación de vía metabólica que corta DNA con citosina metilada. Este sistema identifica y destruye DNA foráneo, el cual no se encuentra metilado.

mrr: inactivación de vía metabólica que corta DNA que tiene citosina o adenina metilada. Identifica y destruye DNA foráneo no metilado.

hsdRMS: inactivación de sistema de metilación y degradación de DNA. Identifica y destruye DNA foráneo no metilado.

ΔlacX74: Delección del operón Lactosa completo. Las bacterias no pueden metabolizar la lactosa.

φ80lacZΔM15: contiene parte del gen lacZ, permitiendo una complementación y recuperación de β-galactosidasa, suficiente para realizar la selección mediante colonias azules o blancas al agregar Xgal en placas.

recA1: mutación en ATPasa dependiente de DNA esencial para la recombinación y reparación general de DNA. Esta mutación reduce la recombinación de plásmidos, aumentando su estabilidad.

araD139: Alteración en la vía metabólica de la arabinosa. Mutación en L-ribulosa-phosphate 4-epimerasa que bloquea el metabolismo de la arabinosa.

Δ(ara-leu) 7697: falta parte del operón leuLABCD. Necesita Leucina en el medio para sobrevivir.

galU: mutación en vía metabólica de la galactosa. Mutantes no pueden metabolizarla.

galK: mutación en metabolismo de la galactosa. Mutantes no pueden metabolizar galactosa y tienen resistencia a la 2-deoxygalactosa. Cuando no son mutantes la metabolizan y se produce un metabolito tóxico para las mismas bacterias.

rpsL: mutación en subunidad S12, de ribosoma 30S. Str^R: resistencia a estreptomicina dada por mutación rpsL

endA1: mutación en la Endonucleasa I, que corta DNA de forma inespecífica. Mejora el rendimiento del plásmido, en cuanto a su incorporación.

nupG: mutación en nucleósido permeasa, que es un gen regulador que permite la expresión constitutiva de genes de síntesis de desoxirribosa. Permite que las células puedan captar e incorporar los plásmidos de gran tamaño.

λ⁻: resistentes a Fago Lambda lisogénico. Al tener mutaciones en recA, no puede inducir la formación del profago si es infectada, pues el fago necesita a recA para insertarse en el genoma de la célula.

Esquemas representativos y ejemplos

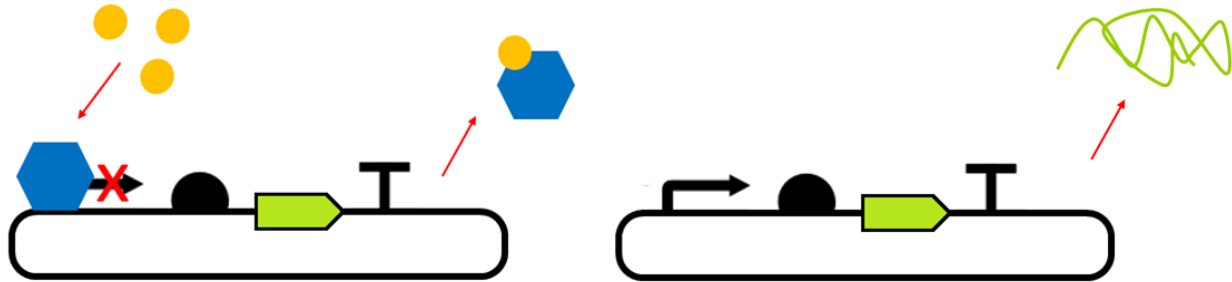


Figura Anexo 1. Esquema representativo de un represor transcripcional. Al tener un reportero dirigido por un promotor regulado por un represor, al no tener presente un inductor o sustancia que interactúe con el represor, este no permitirá la unión de ningún tipo de factor de transcripción ni de la polimerasa al promotor. Sin embargo, al estar presente el inductor en el medio, este es capaz de unirse al represor, provocando generalmente un cambio conformacional que permitirá su salida del promotor, promoviendo la unión de factores y la polimerasa al promotor, permitiendo la transcripción y posterior traducción de la proteína fluorescente del reportero.

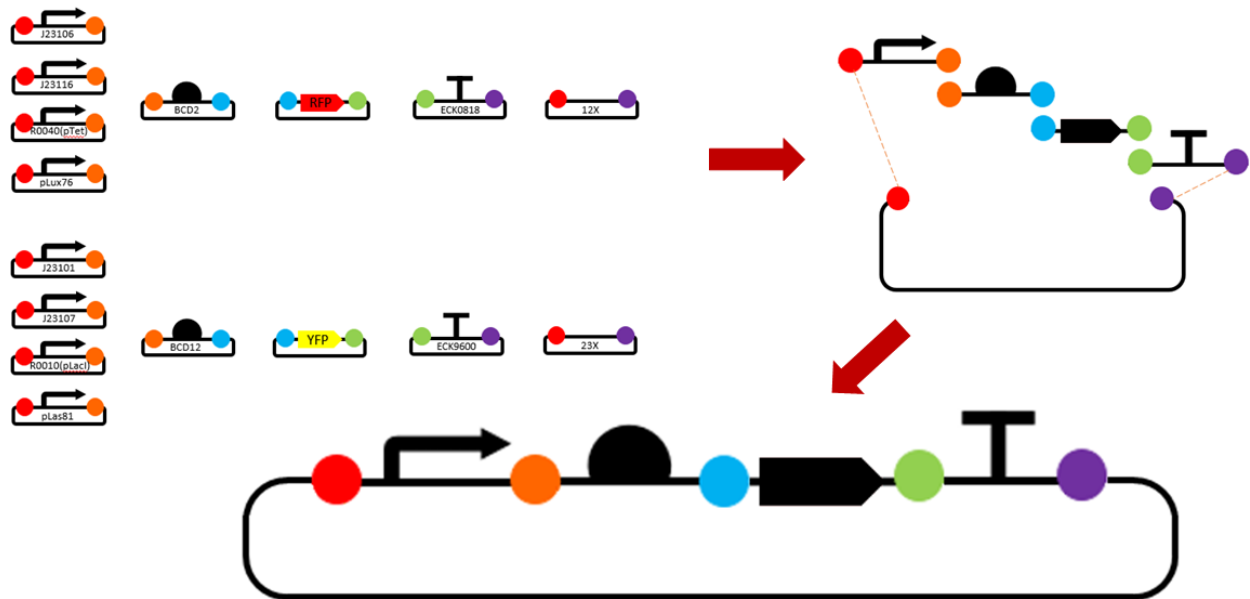


Figura Anexo 2. Esquema de combinaciones para clonamiento Golden Gate. En este ejemplo se representa lo realizado para este trabajo, se cuenta con ocho promotores (flecha curva), dos RBS (medio círculo), dos CDS (flecha recta), dos terminadores (T) y dos vectores aceptores de nivel 1 (vector con espacio liso entre rojo y morado), todas estas partes se consideran de nivel 0. Del total de promotores, cuatro serán fusionados a uno de los RBS, uno de los CDS y uno de los terminadores e introducidos a un vector aceptor de nivel 1. Los otros cuatro promotores serán fusionados a las otras partes de nivel 0 no utilizadas para los primeros cuatro promotores. Al poseer secuencias con

homología (círculos de colores) durante la reacción de Golden Gate con BsaI y Ligasa T4, la primera corta en estas regiones, lo que producirá su unión por complementariedad de bases, permitiendo el ensamblaje ordenado de las partes dentro del vector aceptor, siendo luego ligado por la Ligasa T4, obteniendo Unidades Transcripcionales de nivel 1.

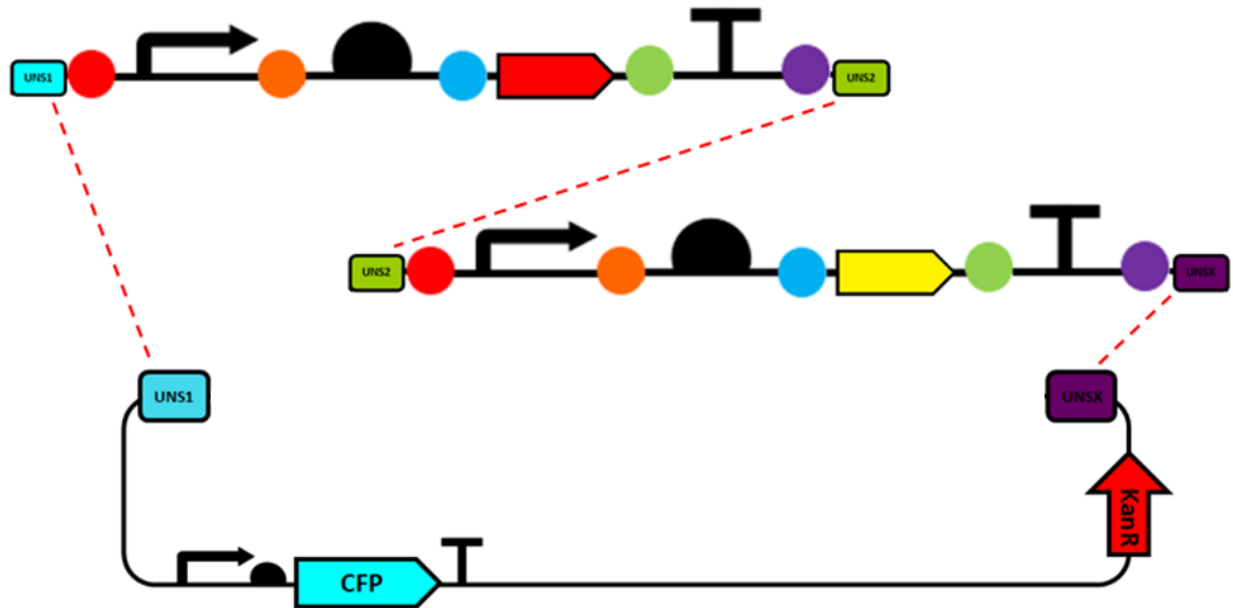


Figura Anexo 3. Esquema de ensamblaje Gibson de los vectores finales. Se ejemplifica la construcción de los vectores de tres reporteros. Al obtener las Unidades Transcripcionales, los vectores aceptores de nivel 1 poseen secuencias UNSes que quedan justo al principio y al final de las TU. De esta forma se amplificaron por PCR desde las UNS correspondiente hasta la siguiente que permitiera el ensamblaje ordenado de las TU dentro del vector de destino. En el caso de este trabajo, las TU que contenían RFP tenían UNS1 y UNS2, mientras que las que contenían YFP tenían UNS2 y UNSX, y el vector de destino poseía UNS1 y UNSX. Se amplificaron todas las partes desde las UNSes por PCR, y posteriormente durante la reacción la Exonucleasa T5 corta los extremos de los fragmentos, lo que permite su unión por complementariedad de bases, mientras que la Polimerasa Taq y la Ligasa T4 rellenan y unen los extremos, obteniendo finalmente los vectores de tres reporteros.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
M9+ Glucosa 0,4%	A	M9 solo	M9 +TOP10 sin plásmidos	std.RFP/std.YF P/std.CFP	std.RFP/std.YF P/std.CFP	std.RFP/std.YF P/std.CFP	std.RFP/std.YF P/std.CFP	std.RFP/std.YF P/std.CFP	pLux76:RFP/std.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/std.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/std.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/std.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/std.YFP/std.CFP
	B	M9 solo	M9 +TOP10 sin plásmidos	std.RFP/std.YF P/std.CFP	std.RFP/std.YF P/std.CFP	std.RFP/std.YF P/std.CFP	std.RFP/std.YF P/std.CFP	std.RFP/std.YF P/std.CFP	pLux76:RFP/std.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/std.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/std.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/std.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/std.YFP/std.CFP
	C	M9 solo	M9 +TOP10 sin plásmidos	pLux76:RFP/pT et.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/pT et.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/pT et.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/pT et.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/pT et.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/pL acl.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/pL acl.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/pL acl.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/pL acl.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/pL acl.YFP/std.CFP
	D	M9 solo	M9 +TOP10 sin plásmidos	pLux76:RFP/pT et.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/pT et.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/pT et.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/pT et.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/pT et.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/pL acl.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/pL acl.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/pL acl.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/pL acl.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/pL acl.YFP/std.CFP
M9+ Glicerol 0,2%	E	M9 solo	M9 +TOP10 sin plásmidos	std.RFP/std.YF P/std.CFP	std.RFP/std.YF P/std.CFP	std.RFP/std.YF P/std.CFP	std.RFP/std.YF P/std.CFP	std.RFP/std.YF P/std.CFP	pLux76:RFP/std.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/std.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/std.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/std.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/std.YFP/std.CFP
	F	M9 solo	M9 +TOP10 sin plásmidos	std.RFP/std.YF P/std.CFP	std.RFP/std.YF P/std.CFP	std.RFP/std.YF P/std.CFP	std.RFP/std.YF P/std.CFP	std.RFP/std.YF P/std.CFP	pLux76:RFP/std.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/std.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/std.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/std.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/std.YFP/std.CFP
	G	M9 solo	M9 +TOP10 sin plásmidos	pLux76:RFP/pT et.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/pT et.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/pT et.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/pT et.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/pT et.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/pL acl.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/pL acl.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/pL acl.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/pL acl.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/pL acl.YFP/std.CFP
	H	M9 solo	M9 +TOP10 sin plásmidos	pLux76:RFP/pT et.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/pT et.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/pT et.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/pT et.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/pT et.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/pL acl.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/pL acl.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/pL acl.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/pL acl.YFP/std.CFP	pLux76:RFP/pL acl.YFP/std.CFP

Figura Anexo 4. Esquema ejemplo de la disposición de vectores en placas para ensayos. Para todos los ensayos las placas fueron divididas en dos regiones mayores por condición. La primera columna se utilizó para los controles de medio solo, la segunda columna para los controles con bacterias sin transformar, de las columnas 3 a la 12 se ubicaron las réplicas por vector, representadas por los distintos colores, y por cada dos filas. Esta disposición se siguió para todos los ensayos realizados.

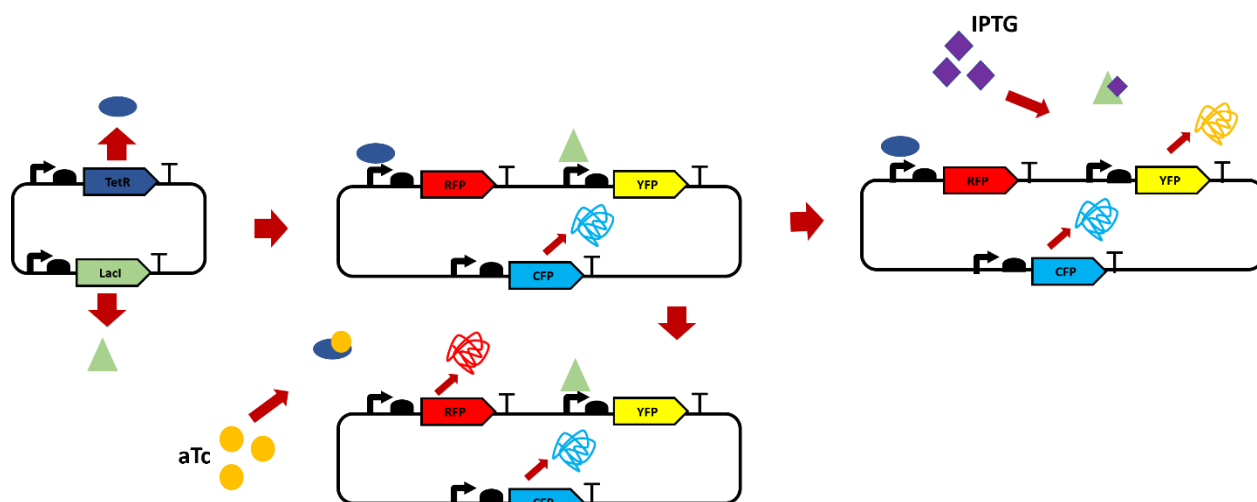


Figura Anexo 5. Regulación de pTet y pLacI en colonias cotransformadas con el vector accesorio. El vector accesorio expresa TetR y LacI, que interactúan con pTet:RFP y LacI:YFP respectivamente. Al no tener inductores presentes, no se expresarán ni RFP ni YFP, mientras que CFP si se expresa, dado que esta fusionado a un promotor constitutivo. Se evaluaron los inductores por separado, por lo que se tendrán dos escenarios, al tener IPTG se induce la expresión de YFP, estando RFP reprimido y CFP se expresará de todas formas. De forma similar, al tener anhidrotetraciclina (aTc) se expresará RFP y CFP, mientras que YFP está reprimido.

Figuras suplementarias

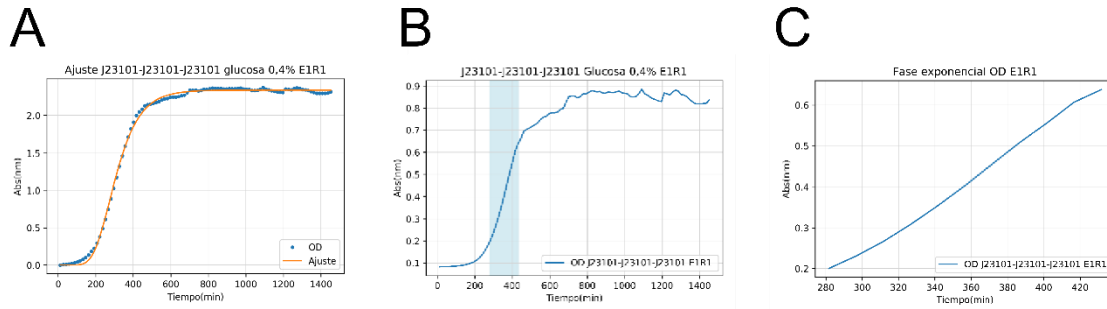


Figura Anexo 6. Ajuste Gompertz realizado al promedio de la colonia del vector J23101-J23101-J23101. Ejemplo de la función de ajuste y delimitación de los datos de la fase exponencial de la densidad óptica para el vector J23101-J23101-J23101. A) Gráfico de la función de ajuste, la línea de color naranja representa el resultado de la función de ajuste, mientras que la línea punteada azul representa los datos reales de la densidad óptica. B) Gráfico de densidad óptica, respecto al tiempo, la zona marcada en celeste representa la ubicación de la fase exponencial en base a los parámetros entregados por el ajuste y los cálculos con relación a estos. C) Gráfico de datos de la fase exponencial de la densidad óptica respecto al tiempo, destacados en el gráfico anterior.

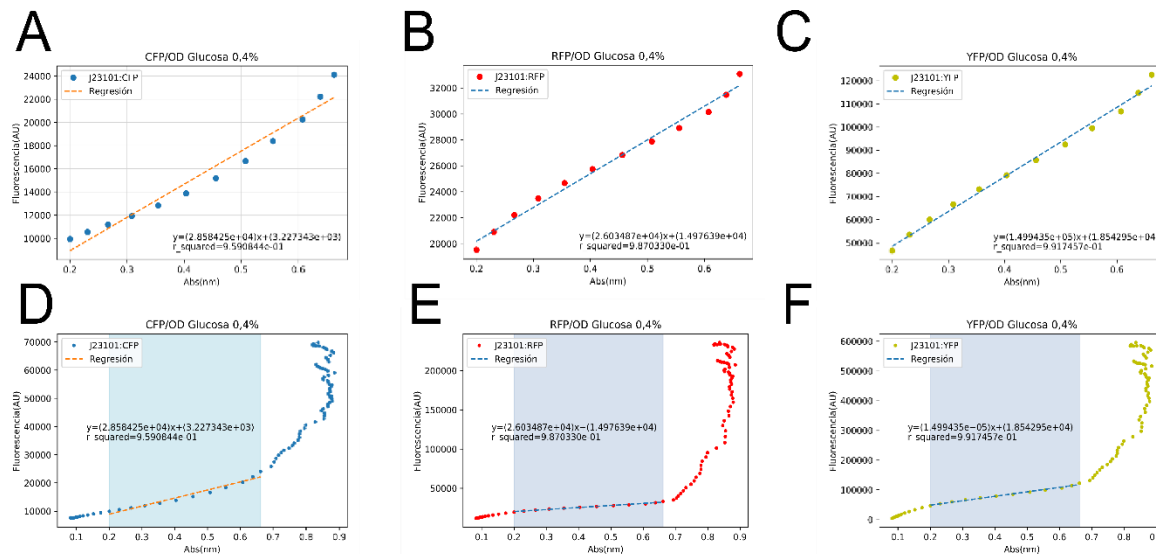


Figura Anexo 7. Ajuste lineal realizado a las mediciones de fluorescencia en base a lo determinado por ajuste de densidad óptica. Ejemplo de los ajustes realizados para las mediciones de fluorescencia del vector J23101-J23101-J23101. A-C) Mediciones de fluorescencia respecto a densidad óptica, las líneas punteadas de colores corresponden a los datos de fluorescencia, y las líneas punteadas corresponde al ajuste realizado. Se indica además la ecuación de la recta y su R cuadrado. D-F) Gráficos de fluorescencia respecto a densidad óptica, la zona azul representa la fase exponencial de los datos determinada previamente. Se indica la ecuación de la recta y su R cuadrado.

En las figuras del anexo 8 a 11 se graficaron los valores de α_p de los reporteros, los cuales se identifican por reportero (color) y por cada replica y condición. Se observa que por condición los valores de α_p son similares para cada medición (RFP, YFP o CFP), mientras que entre condiciones son muy diferentes.

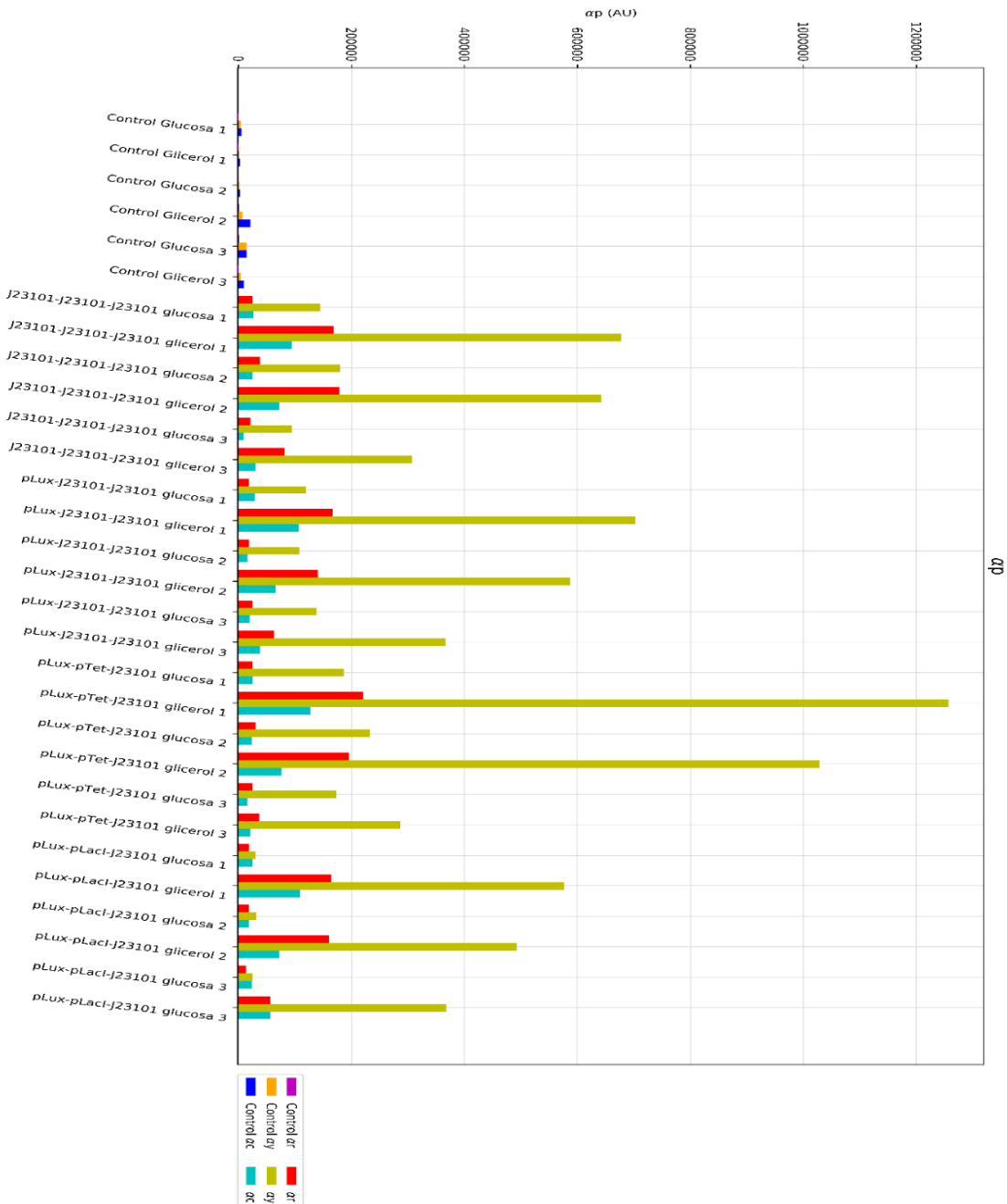


Figura Anexo 8. Valores de alfa para ensayo 1.

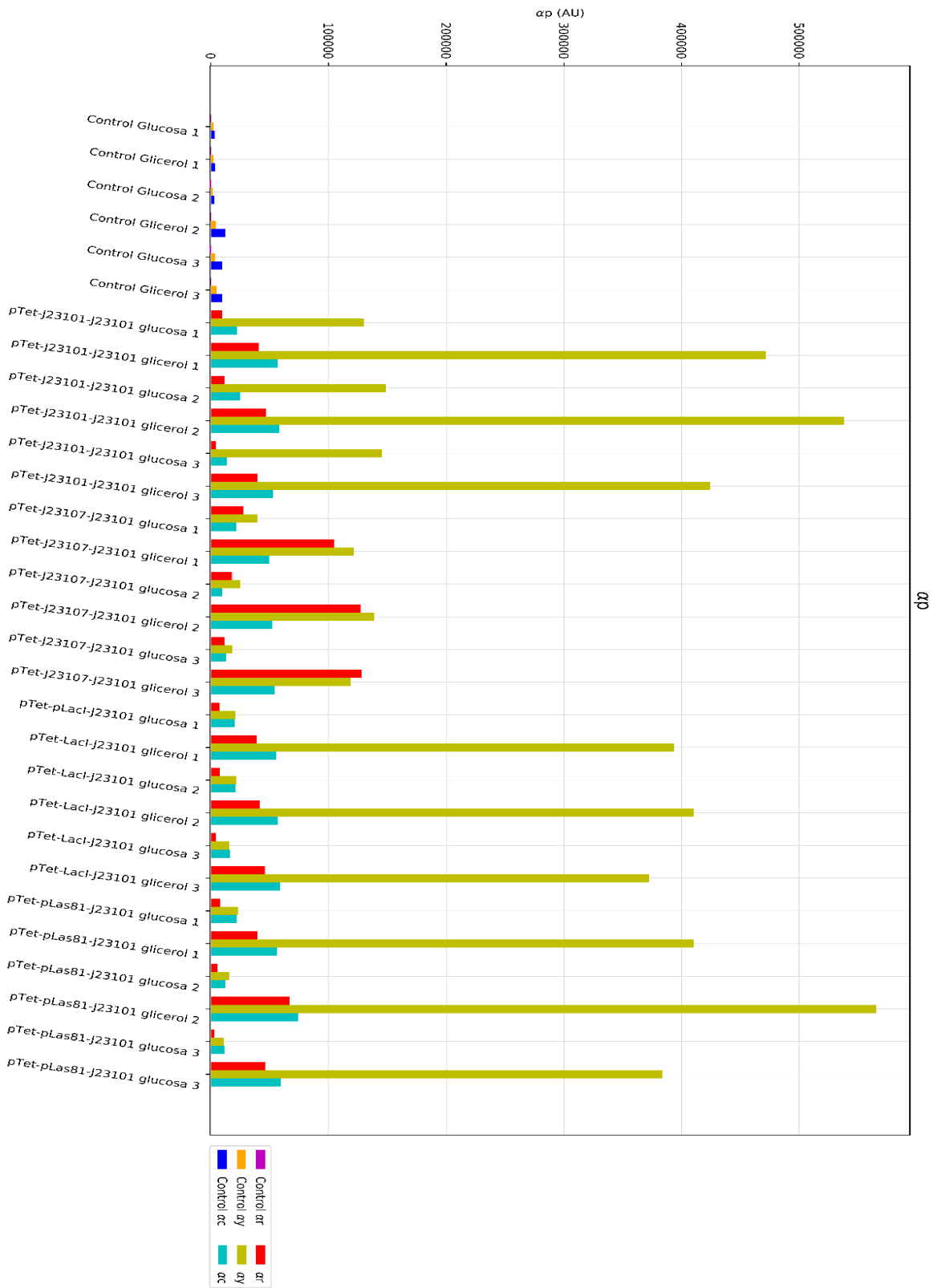


Figura Anexo 9. Valores de alfa para ensayo 2.

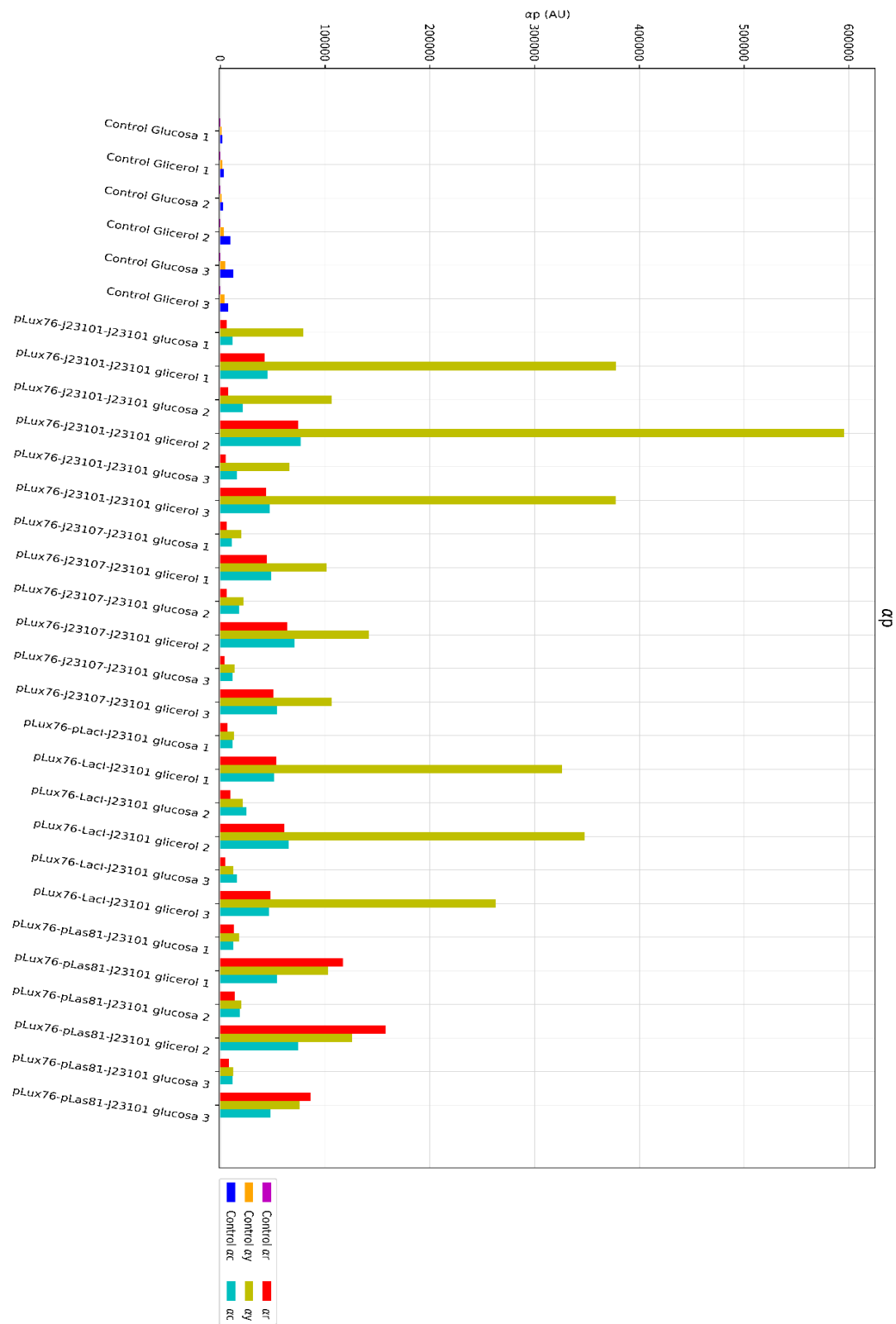


Figura Anexo 10. Valores de alfa para ensayo 3.

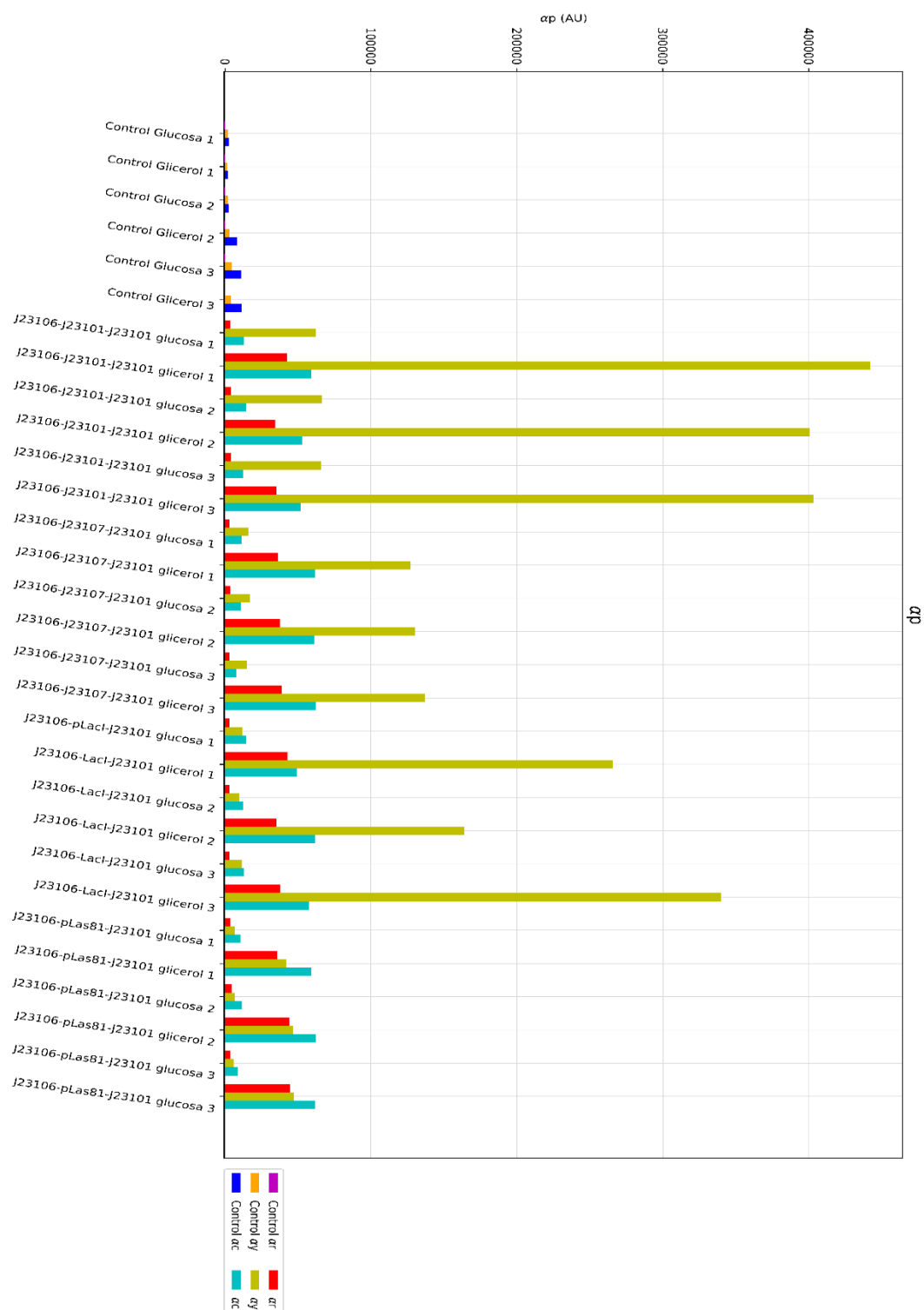


Figura Anexo 11. Valores de alfa para ensayo 4.

En las figuras del anexo 2 a 15 se graficaron los valores de ρ_p de los reporteros utilizando CFP como referencia, los cuales se identifican por reportero y condición (colores) y réplicas. Se observa que entre condiciones los valores de ρ_p se vuelven más similares para cada medición (RFP, YFP), dado que al utilizar referencias se reduce parte de la variabilidad de los valores.

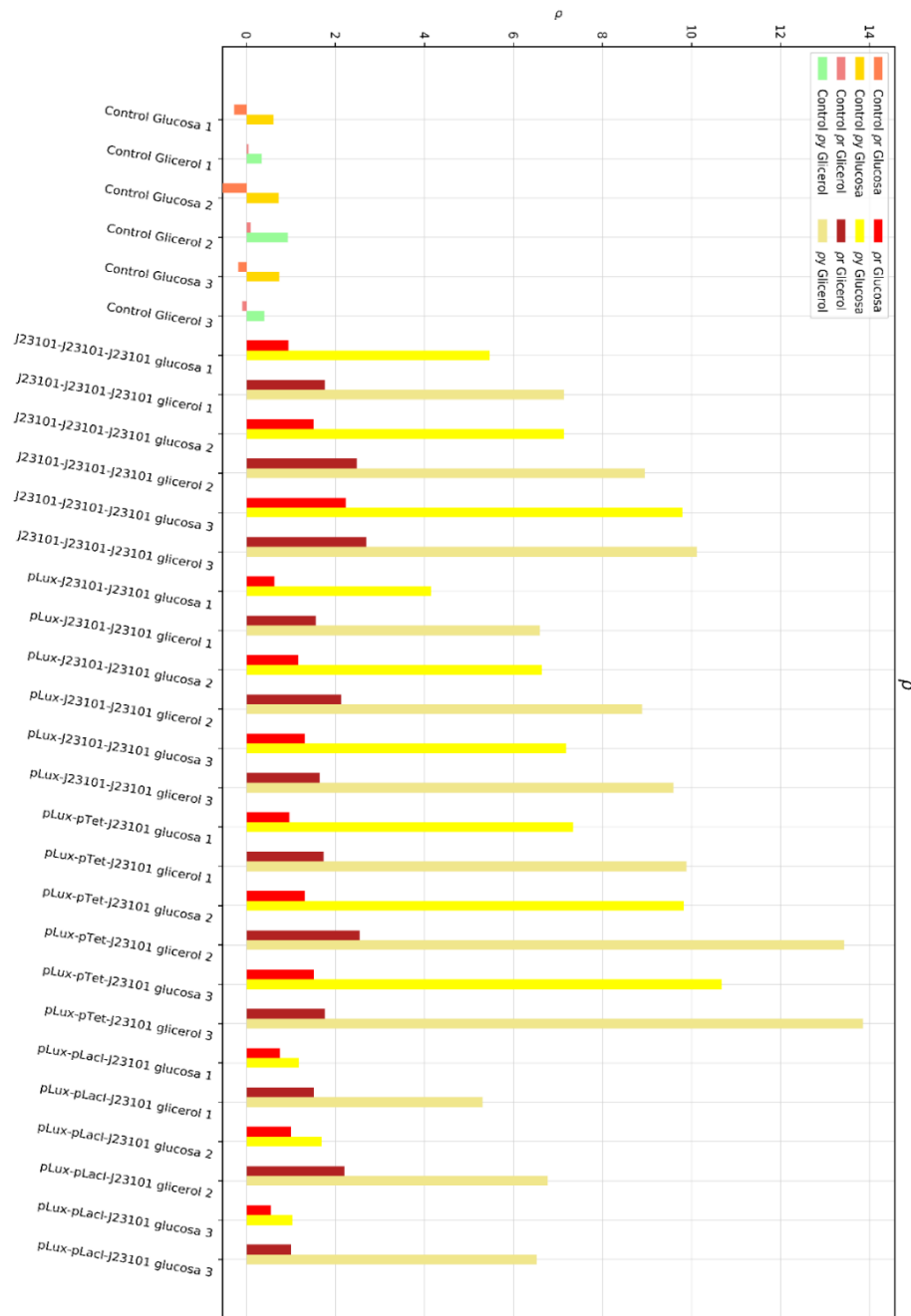


Figura Anexo 12. Valores de Rho ensayo 1.

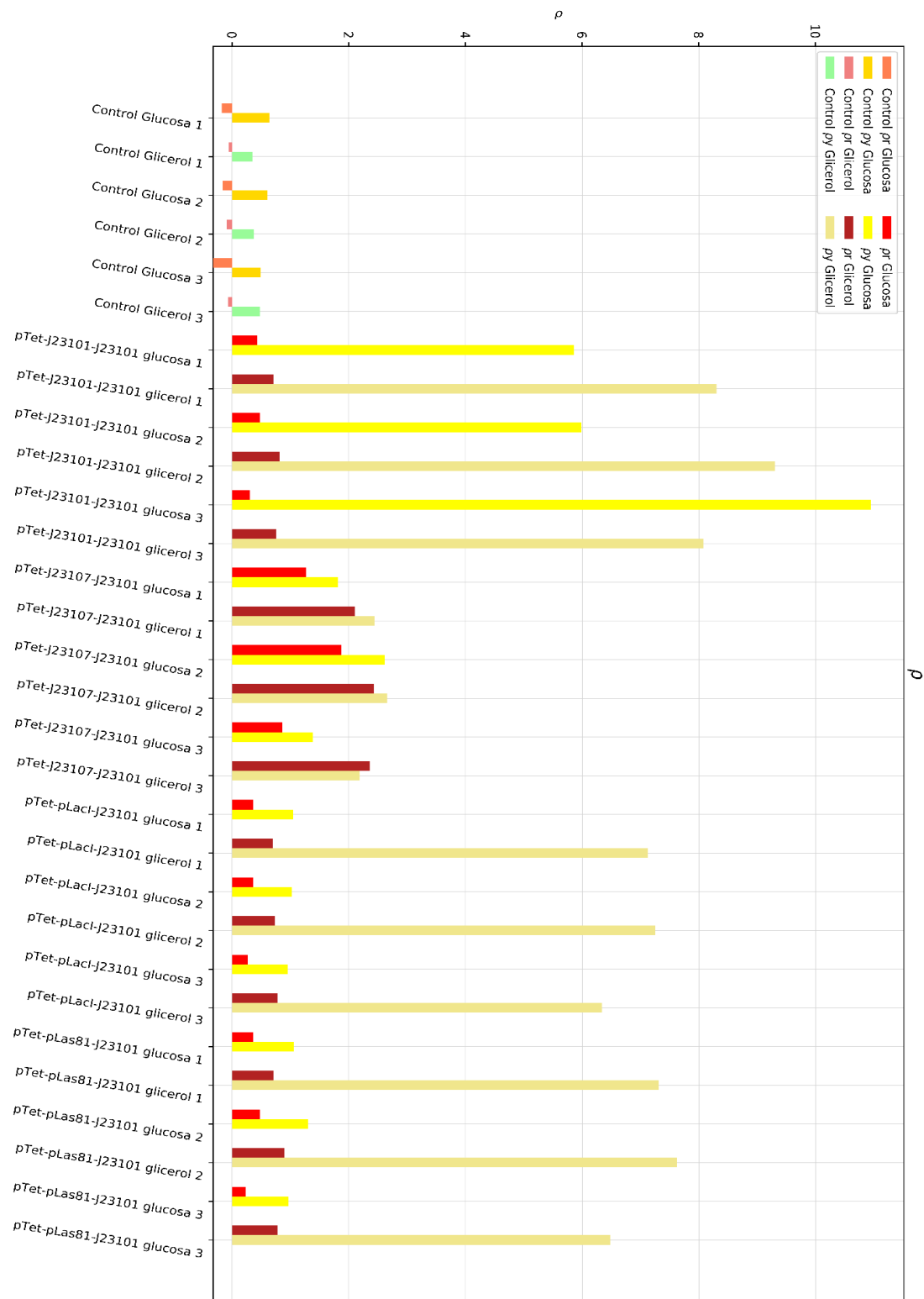


Figura Anexo 13. Valores de Rho ensayo 2.



Figura Anexo 14. Valores de Rho ensayo 3.

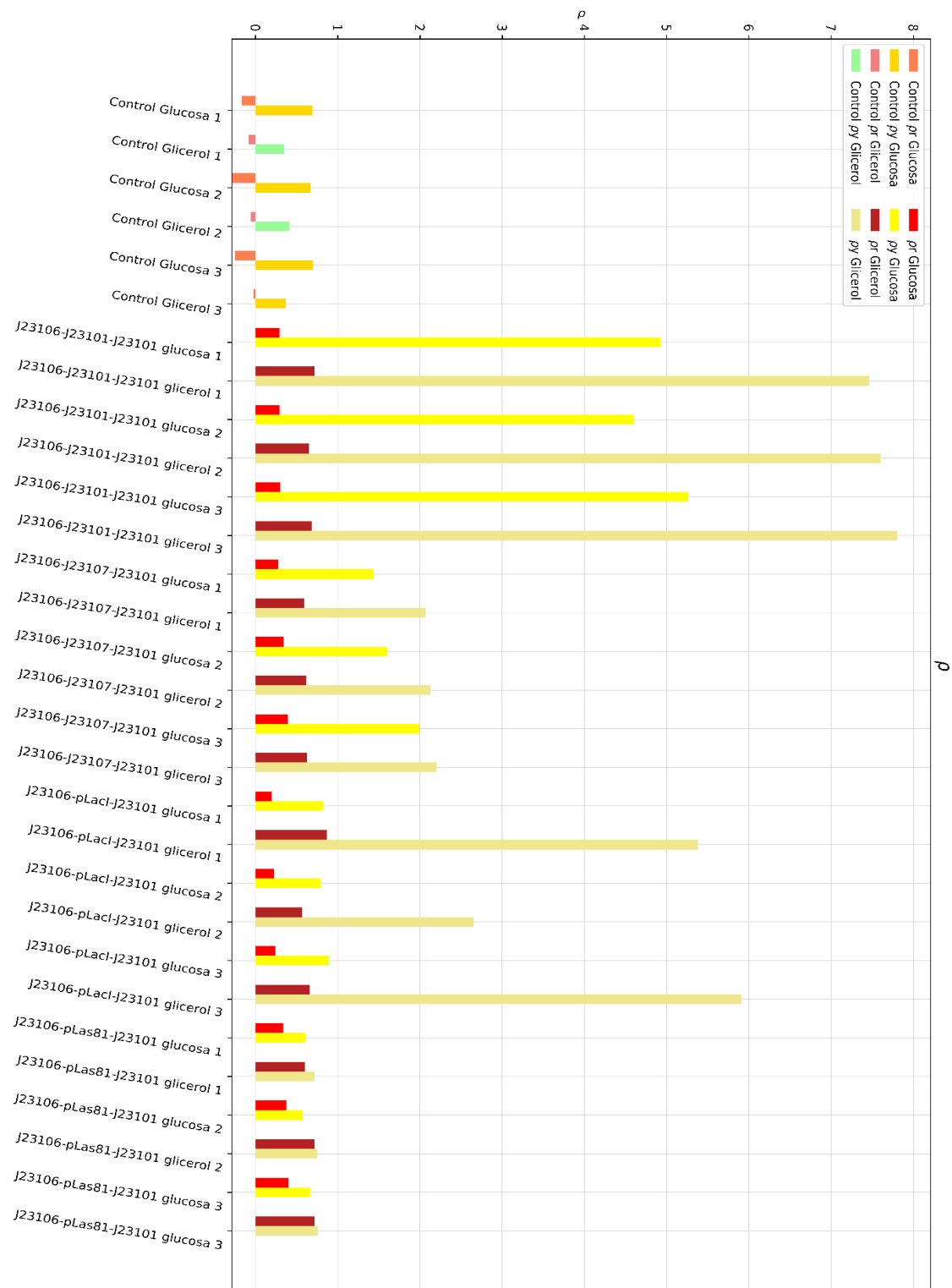


Figura Anexo 15. Valores de Rho ensayo 4.

En las figuras del anexo 16 a 19 se graficaron los valores de ρ_r de los reporteros utilizando YFP como referencia, los cuales se identifican por condición (colores) y réplicas. Se observa que entre condiciones los valores de ρ_r se vuelven similares, pero sigue existiendo variabilidad entre los valores de las distintas condiciones.

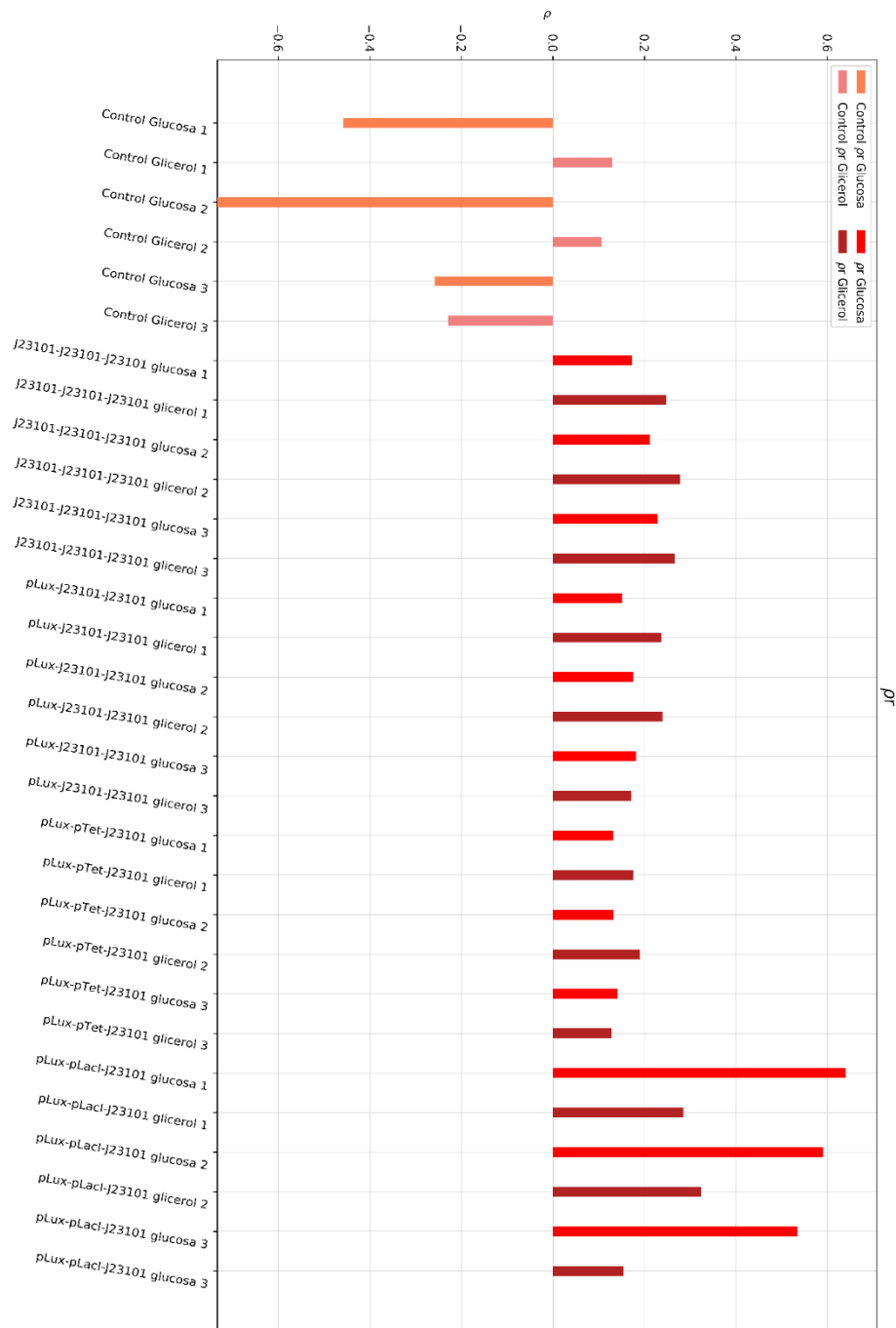


Figura Anexo 16. Valores de Rho usando YFP como referencia ensayo 1.

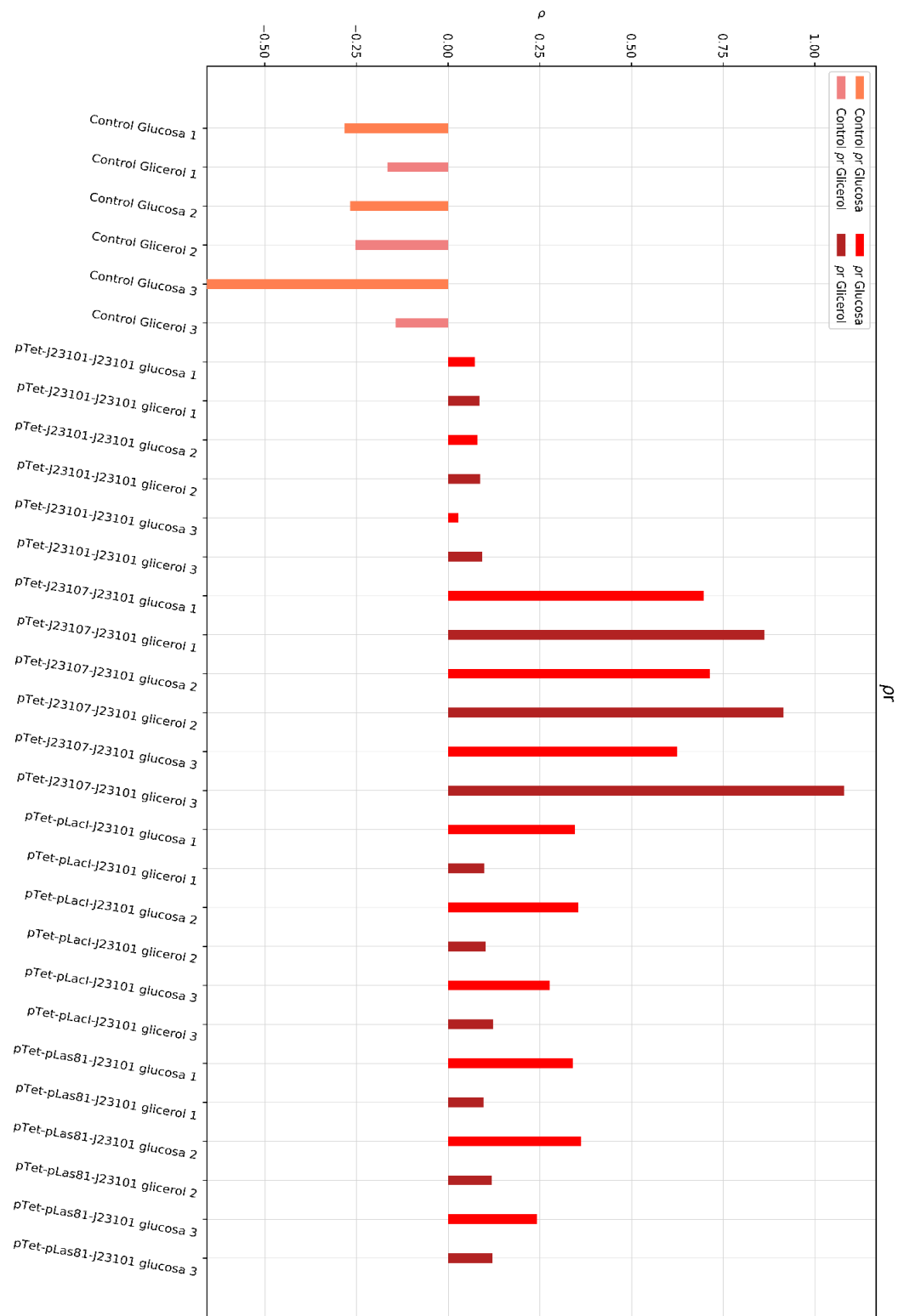


Figura Anexo 17. Valores de Rho usando YFP como referencia ensayo 2.

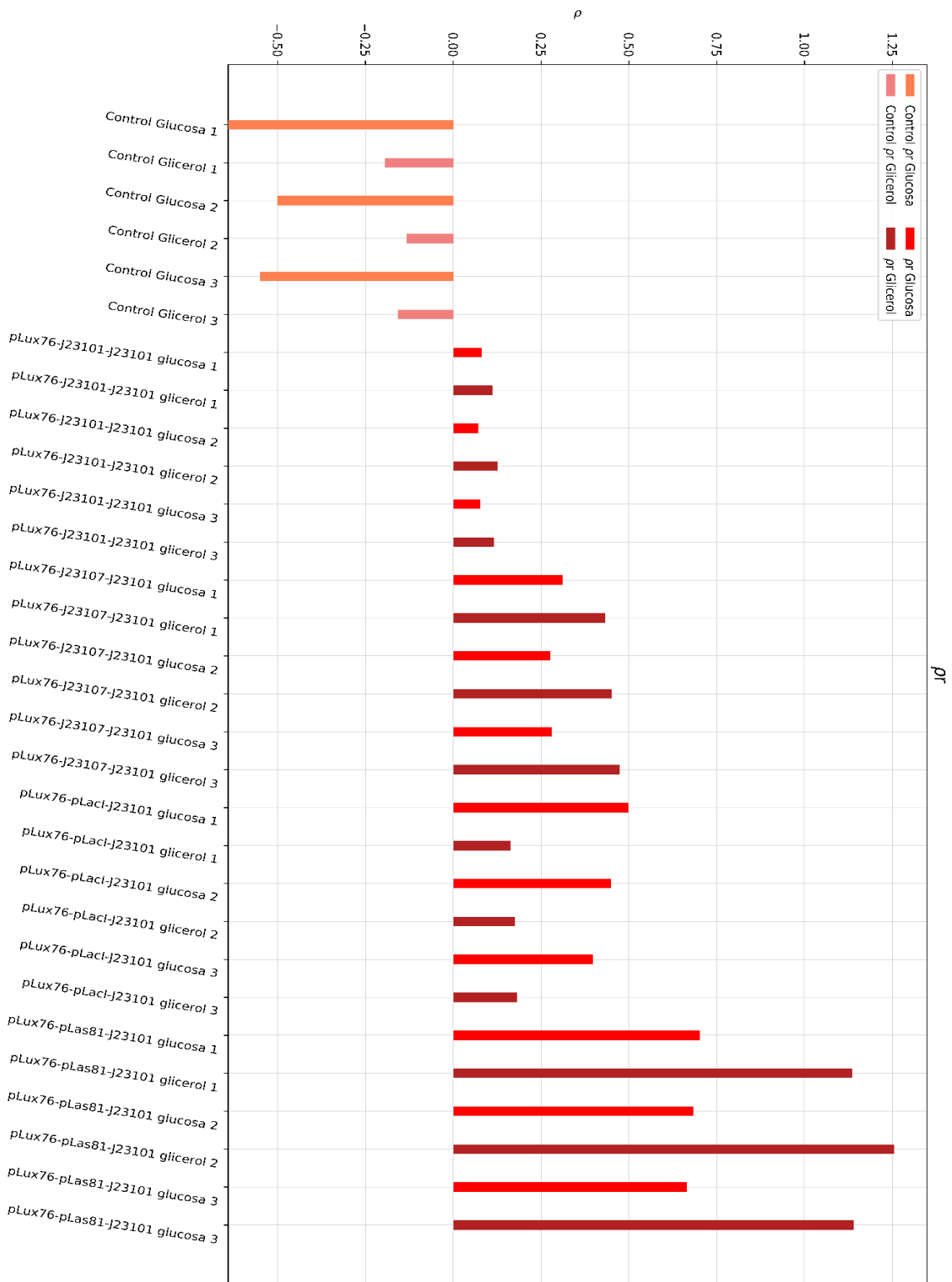


Figura Anexo 18. Valores de Rho usando YFP como referencia ensayo 3.

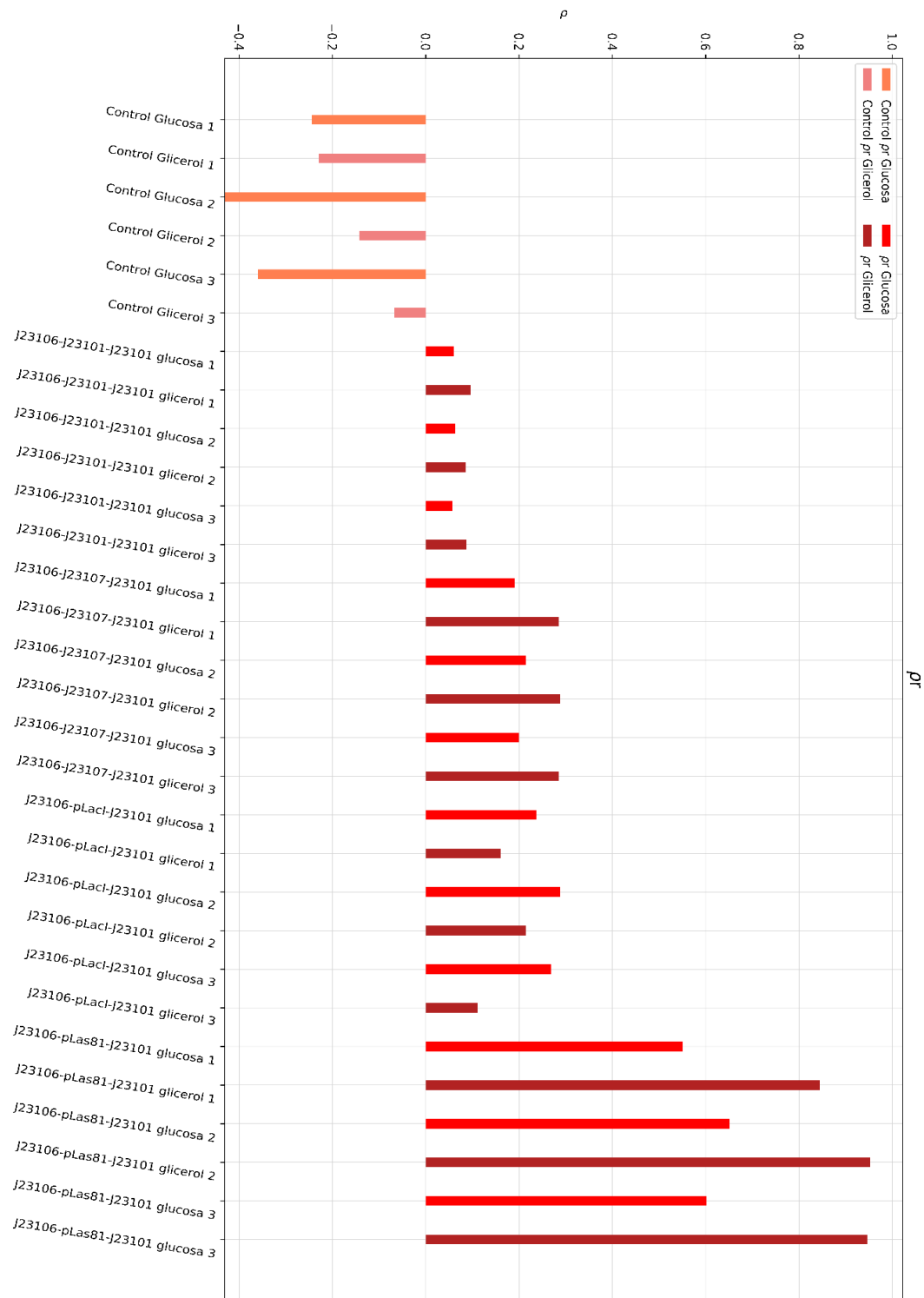


Figura Anexo 19. Valores de Rho usando YFP como referencia ensayo 4.